

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Mikulášková

VLIV ANTIDIABETICKY PŮSOBÍCÍCH LÁTEK NA VÝVOJ
INZULÍNOVÉ REZISTENCE A NEURODEGENERATIVNÍCH
ZMĚN V MYŠÍCH MODELECH DIABETU 2. TYPU

Impact of antidiabetic substances on development of insulin
resistance and neurodegenerative changes in mouse models
of type 2 diabetes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.
Konuzultantka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru RVO 61388963 AV ČR a byla podporována GA ČR, grant č. P303/12/0576 a grantem MŠMT Mobility č. 7AMB12FR011.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha, v.v.i.) za výborné vedení mé práce, motivaci a za její obětavou pomoc a konzultace k experimentální činnosti a k psaní mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D.

Také bych ráda poděkovala Ing. Blance Železné, CSc. a Mgr. Andree Špolcové za rady při psaní mé diplomové práce a za pomoc a rady při experimentální činnosti, Ing. Miroslavě Blechové za syntézu analogu PrRP, dále Mgr. Veronice Nagelové za pomoc a rady při experimentální činnosti a také celé pracovní skupině RNDr. Lenky Maletínské, CSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a příteli Petrovi za podporu a trpělivost při mých studiích.

ABSTRAKT

Mnohé epidemiologické a experimentální studie ukazují, že u pacientů s metabolickými poruchami jako je diabetes mellitus 2. typu (DM2), inzulinová rezistence nebo obezita je vyšší riziko vedoucí k poruchám kognitivních funkcí, rozvoji demence a Alzheimerovy nemoci (AN). Porušení inzulinové signalizace v mozku může přispívat ke dvěma patologickým změnám, které vedou k rozvoji AN. Vznikají nerozpustné plaky amyloidního beta peptidu a dochází k hyperfosforylaci proteinu tau, který formuje neurofibrilární spleti.

Diplomová práce je zaměřena na zkoumání inzulinové signalizace v hipokampu v mozku myši s inzulinovou rezistencí, její vliv na vývoj neurodegenerativních změn a dále na ovlivnění této signalizační kaskády a neurodegenerativních změn látkami zvyšujícími citlivost k inzulinu.

Jako první byla zkoumána inzulinová signalizace a fosforylace proteinu tau v hipokampech myších modelů diabetu 2. typu. Byly použity lipodystrofické A-ZIP F-1 myši a myši s obezitou navozenou glutamátem sodným (MSG myši). V hipokampech A-ZIP F-1 myši oproti kontrolám nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v inzulinové signalizaci a fosforylaci proteinu tau. V hipokampech MSG myši byla snížena fosforylace kinas inzulinové signalizace včetně Ser9 na glykogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Zvýšení fosforylace Ser9 inhibuje kinasovou aktivitu GSK-3 β a snížení ji naopak aktivuje. Protože GSK-3 β je jednou z nejdůležitějších kinas proteinu tau, dá se předpokládat, že aktivace GSK-3 β vedlo ke zvýšení fosforylace proteinu tau na epitopech Ser396 a Thr231 v porovnání s myši kontrolními.

Dále byly u MSG myši zkoumány účinky analogu inkretinového hormonu GLP-1 (*glucagon-like peptide*) liraglutidu, který je v současné době používán jako lék proti DM2 a dále lipidizovaného analogu PrRP31 (*prolactin-releasing peptide*), anorexigenního neuropeptidu. V porovnání s kontrolními myši došlo po 14-ti denním subkutánním injikování peptidů k signifikantnímu zvýšení fosforylace kinas v inzulinové signalizační kaskádě (PDK1 (Ser241), Akt (Thr308) a GSK-3 β (Ser9)) a dále ke snížení fosforylace proteinu tau v hipokampu v mozku na epitopech Ser396, Thr231 a Thr212. Naše výsledky ukazují, že inzulinová rezistence by mohla přispívat k rozvoji neurodegenerativních změn při AN, a že látky zlepšující citlivost k inzulinu, jako jsou například liraglutid a analog PrRP31, by mohly být využity k potlačení těchto změn.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova nemoc

inzulínová rezistence

diabetické myši

fosforylace Tau

ABSTRACT

Numerous epidemiological and experimental studies have shown that patients suffering from metabolic disorders such as type 2 diabetes mellitus (TDM2), insulin resistance or obesity are at a higher risk of cognitive functions impairment and developing Alzheimer's disease (AD). Impairment of insulin signalling in the brain could contribute to two pathological changes which leads to AD development that include insoluble senile plaques and neurofibrillary tangles, containing an abnormally hyperphosphorylated tau protein (Tau).

This work is focused on investigating of insulin signaling in hippocampi in the brains of mice models of insulin resistance, impact of disturbed insulin signaling on hyperphosphorylation of Tau, and possible beneficial effect of insulin sensitizing agents on insulin signaling and Tau phosphorylation in the hippocampi of diabetic mice.

The first, we examined insulin signaling and phosphorylation of Tau in hippocampi in two mouse models of TDM2 - lipodystrophic A-ZIP F-1 mice and monosodium glutamate obese mice (MSG mice). We did not observe any changes in insulin signaling and Tau phosphorylation in hippocampi of A-ZIP F-1 mice compared to controls. In the hippocampi of MSG mice there was attenuated phosphorylation of kinases of insulin signalling including Ser9 of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Attenuated phosphorylation of Ser9 inhibits kinase activity of GSK-3 β and augmented phosphorylation of Ser9 conversely activates kinase activity GSK-3 β . GSK-3 β is one of the most important kinases of Tau, so activation seems to lead to phosphorylation of Tau at Ser396 and Thr231 in comparison with control mice.

We tested impact of analogue of glucagon like peptide (GLP-1) liraglutide which is used for TDM2 treatment and lipidized analogue of prolactin releasing peptide (PrRP31), an anorexigenic neuropeptide, in MSG mice. After 14 days of subcutaneous injections of these peptides, a significant increase in phosphorylations of kinases in insulin signaling (PDK1 (Ser241), Akt (Thr308) and GSK-3 β (Ser9)) occurred and phosphorylations of Tau at Ser396, Thr231 and Thr212 were attenuated in the hippocampi in MSG mice. Our results show that insulin resistance could be involved in development of neurodegenerative changes in AD and insulin sensitising agents such as liraglutide and PrRP31 analogue could prevent these changes.

KEY WORDS

Alzheimer's disease

insulin resistance

diabetic mice

Tau phosphorylation

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK - 10 -

1. ÚVOD - 12 -

2. TEORETICKÝ ÚVOD - 14 -

2.1 Alzheimerova nemoc : Diabetes 3.typu	- 14 -
2.1.1 Alzheimerova nemoc	- 14 -
2.1.1.1 Senilní plaky	- 14 -
2.1.1.2 Neurofibrilární spleti	- 15 -
2.1.2 Fosforylace proteinu tau	- 16 -
2.1.3 Diabetes mellitus 2. typu a Alzheimerova nemoc	- 16 -
2.1.4 Inzulínová signální kaskáda	- 17 -
2.1.5 O-glykosylace	- 18 -
2.2 Centrálně působící látky zvyšující citlivost k inzulínu	- 19 -
2.2.1 Hormony podporující sekreci inzulínu	- 19 -
2.2.2 Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)	- 21 -
2.3 Zvířecí modely pro výzkum DM2 a AN	- 23 -
2.3.1 Zvířecí modely pro výzkum AN	- 23 -
2.3.2 Zvířecí modely pro výzkum DM2	- 23 -
2.3.2.1 „Zucker“ obézní potkani - fa/fa potkani	- 24 -
2.3.2.2 Db/db myši	- 25 -
2.3.2.3 A-ZIP F-1 myši	- 26 -
2.3.2.4 MSG myši	- 27 -

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - 28 -

3.1 Materiál	- 28 -
3.1.1 Chemikálie	- 28 -
3.1.2 Protilátky	- 29 -
3.1.3 Přístroje	- 30 -
3.1.4 Peptidy	- 30 -
3.2 Experimentální zvířata	- 31 -
3.2.1 A-ZIP F-1 myši	- 31 -
3.2.2 MSG myši	- 31 -
3.2.3 Injektování peptidů zvyšujících citlivost k inzulínu	- 31 -
3.3 Morrisovo vodní bludiště (MWM)	- 32 -
3.4 Test úzkosti MSG myši a jejich kontrol - elevated plus maze (EPM)	- 33 -
3.5 Glukózový toleranční test u MSG myši po intervencích s liraglutidem a analogem PrRP31	- 33 -
3.6 Odběr krve a orgánů diabetických myších modelů	- 33 -
3.6.1 A-ZIP F-1 myši	- 33 -
3.6.2 MSG myši	- 33 -
3.6.3 Metabolické parametry A-ZIP F-1 a MSG myši	- 34 -

3.7 Zpracování myších hipokampů	- 34 -
3.8 Imunodetekce specifického proteinu - metoda Western blot	- 34 -
3.8.1 Gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného	- 34 -
3.8.2 Přenos proteinů na PVDF nebo nitrocelulosovou membránu	- 35 -
3.8.3 Imunodetekce fosforylace kinas inzulínové kaskády a proteinu tau	- 35 -
3.8.4 Detekce aktinu	- 35 -
3.9 Statistické vyhodnocení výsledků	- 36 -
 4. VÝSLEDKY - 37 -	
4.1 Základní metabolické parametry u A-ZIP F-1 myši	- 37 -
4.2 Základní metabolické parametry u MSG myši	- 38 -
4.2.1 MSG myši ve věku 2 a 6 měsíců	- 38 -
4.2.2 MSG myši po intervenci s látkami zvyšujícími citlivost k inzulínu ve věku 6 měsíců	- 40 -
4.3 Test prostorového učení a paměti v Morrisově vodním bludišti (MWM)	- 41 -
4.3.1 Test MWM u A-ZIP F-1 myši	- 41 -
4.3.2 Test MWM u MSG myši ve věku 6 měsíců	- 42 -
4.4 Test úzkosti u MSG myši - elevated plus maze (EPM)	- 43 -
4.5 Glukózový toleranční test (GTT) u MSG myši	- 44 -
4.6 Inzulínová signalační kaskáda a fosforylace proteinu tau v hipokampech A-ZIP F-1 myši	- 45 -
4.7 Inzulínová signalační kaskáda a fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myši ve věku 2 a 6 měsíců	- 47 -
4.8 Inzulínová signalační kaskáda v hipokampech MSG myši ve věku 6 měsíců po opakovaném podání lipidizovaného analogu PrRP31 a liraglutidu	- 49 -
4.9 Imunodetekce fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myši ve věku 6 měsíců po opakovaném podání lipidizovaného analogu PrRP31 a liraglutidu	- 51 -
 5. DISKUSE - 53 -	
5.1 Charakterizace lipodystrofických A-ZIP F-1 myši	- 53 -
5.2 Charakterizace myši s obezitou navozenou MSG	- 54 -
5.3 MSG myši po intervencích s liraglutidem a analogem PrRP31	- 55 -
 6. ZÁVĚR - 57 -	
 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY - 58 -	

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AN – Alzheimerova nemoc

APP – prekurzorový amyloidní protein

APS – persíran amonný

ARC - nucleus arcuatus

A-ZIP F-1 myši - transgenní myši exprimující protein A-ZIP F-1

A β – amyloidní beta peptid

BSA - hovězí sérový albumin

CNS – centrální nervová soustava

db/db myši – obézní diabetické myši

DIO myši – dietou indukované obézní myši

DMN - dorsomediální jádro

DM2 – diabetes mellitus 2. typu

EPM – elevated plus maze

ERK – extracellular signal-regulated kinase

fa/fa potkani - „Zucker“ obézní potkani

GIP – gastric inhibitory polypeptide

GLP-1 – glucagon like peptide-1

GSK-3 - glykogen synthasa kinasa 3

GTT – glukózový toleranční test

IGF-1 – inzulínový růstový faktor-1

IRS – inzulín-receptor-substrát

MAP – microtubule associated protein

MAPK – mitogen-activated protein kinase

MSG - glutamát sodný

MSG myši - myši s obezitou vyvolanou glutamátem sodným

MWM – Morris water maze – Morrisovo vodní bludiště

NIRKO - neuron insulin receptor specific knockout

NMDA – N-methyl-D-aspartát

NTS - nucleus tractus solitarius

O-GlcNAc - O-glykosylace přidáním N-acetylglukosaminového zbytku

PBS – fyziologický roztok pufovaný fosfátem (pH=7,4)

PDK-1 - fosfoinositid-dependentní proteinkinasa 1

peptid CART - cocaine-and amphetamine-regulated transcript

PIP2 - fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfát

PIP3 - fosfatidyl-inositol-3, 4,5-trisfosfát

PI3K - fosfatidyl-inositol-3-kinasa

PRL – prolaktin

PrRP – peptid uvolňující prolaktin

PS1 - presenilin-1

PVDF – polyvinylidendifluorid

PVN - paraventriculární jádro

SDS - dodecylsulfát sodný

TBS – fyziologický roztok pufovaný TRIS (pH=7,6)

TBS/Tween – TBS s přídavkem 1% Tween-20

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin

VLRN - ventrolaterální retikulární jádro

WAT – white adipose tissue – bílá tuková tkáň

ZDF - zucker diabetic fatty

1. ÚVOD

Jednou z celosvětově nejvíce rozšířených, neléčitelných nemocí je Alzheimerova nemoc (AN). V roce 2010 bylo na světě více než 35 milionů nemocných a odhaduje se, že pokud nebude zavedena účinná léčba, tento počet vzroste během 30-ti následujících let na 115 milionů nemocných. Největším problémem u hledání účinné terapie zůstává fakt, že nejsou přesně známy mechanismy jejího vzniku [1].

V průběhu AN dochází ke dvěma patologickým změnám neuronů v mozku – vznikají nerozpustné extracelulární plaky amyloidního beta peptidu ($A\beta$) a dochází k hyperfosforylaci intracelulárního cytoskeletálního proteinu tau [2].

Mnohé studie popisují vztah mezi AN a diabetes mellitus 2. typu (DM2). Bylo zjištěno, že v mozku pacientů s AN je porušena inzulinová signalizace a dochází k centrální inzulinové rezistenci [3, 4].

V této práci byly pro objasnění souvislosti AN a DM2 používány dva myší modely inzulinové rezistence: myší model lipodystrofického diabetu A-ZIP F-1 myši a myši s obezitou vyvolanou glutamátem sodným (MSG myši). U MSG myši je obezita vyvolána brzy po narození subkutánně podávaným glutamátem sodným.

Byla zkoumána inzulinová signalizační kaskáda a hyperfosforylace proteinu tau v mozku (v oblasti hipokampu) MSG myši před a po aplikaci látek zvyšujících citlivost k inzulinu.

Zkoumání centrálních účinků antidiabetických látek může pomoci objasnit mechanismus neurodegenerativních změn při Alzheimerově nemoci.

Cíle práce:

1. Stanovení metabolických parametrů spojených s obezitou a diabetem a inzulínové signalizace a hyperfosforylace proteinu tau v hipokampech myších modelů inzulínové rezistence - lipodystrofických myší A-ZIP F-1 a myší s obezitou vyvolanou MSG.
2. Stanovení centrálních účinků látek zvyšujících citlivost k inzulínu na hyperfosforylaci proteinu tau u myší s vyvolanou obezitou MSG.

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Alzheimerova nemoc : Diabetes 3.typu

2.1.1 Alzheimerova nemoc

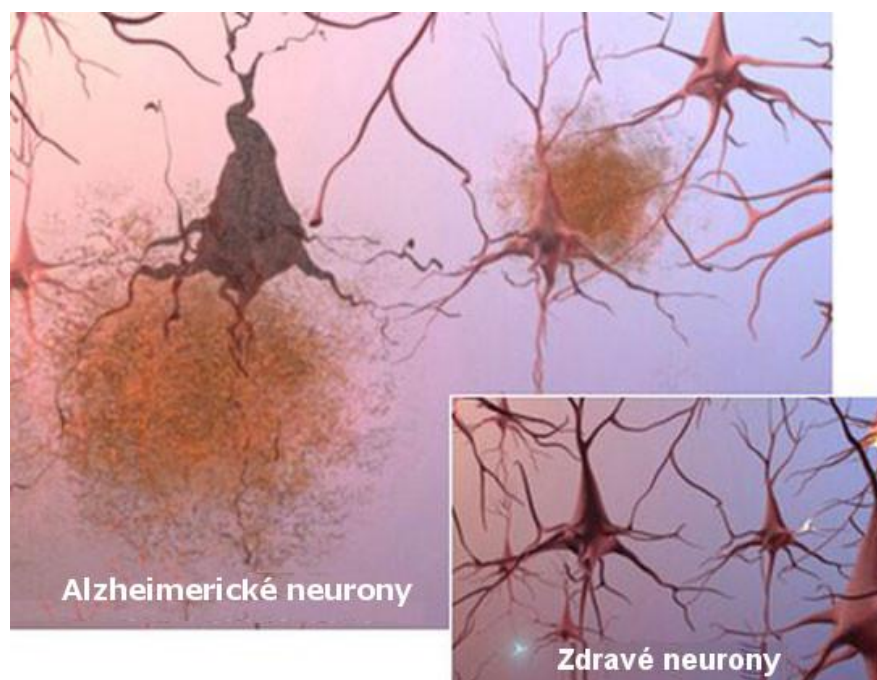
Alzheimerova nemoc je závažné neurodegenerativní onemocnění mozku, postihující zejména jedince staršího věku. Nejdříve se nemoc projevuje ztrátou paměti, poruchami učení, změnami v chování, zhoršenou orientací v čase a prostoru, ztrátou autonomních funkcí, až nakonec dochází k úplné demenci. Průměrně 9 let po stanovení diagnózy nastává smrt [5, 6].

AN prozatím není léčitelná, lze však zpomalit a ovlivnit její průběh. V současné době se pro zmírnění příznaků používají například inhibitory acetylcholinesterasy, které zvyšují koncentraci acetylcholinu v mozku a tím zlepšují kognitivní funkce. Dalším příkladem je memantin, který je inhibítorem NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů a přispívá ke zlepšení paměti [5].

Z neuropatologického hlediska dochází při AN ke dvěma patologickým změnám v mozku - vznikají neurofibrilární spleti a senilní plaky. V mozku pacientů s AN je jako první postižen hipokampus, který je centrem krátkodobé paměti a jehož činnost je spojena s ukládáním informací do dlouhodobé paměti [7, 8].

2.1.1.1 Senilní plaky

Senilní plaky hrají primární roli v rozvoji AN. Jsou to extracelulární agregáty, které vznikají shlukováním oligomerů nerozpustného amyloidního beta peptidu ($A\beta$). $A\beta$ je tvořen 36-43 aminokyselinami a vzniká z prekurzorového amyloidního proteinu (APP). APP patří mezi membránové proteiny a přirozeně se vyskytuje v buňkách centrální nervové soustavy (CNS) a také na periférii. Jako regulátor se účastní tvorby synapsí a transportu železa. Za fyziologických podmínek je APP štěpen α -sekretasou na rozdíl od patologických stavů, kdy je převážně štěpen sekretasami β a γ , čímž dochází k tvorbě $A\beta$. Při tvorbě nadměrného množství $A\beta$ dochází k jeho polymeraci a ukládání ve formě extracelulárních nerozpustných plaků (obr.1). Dochází i k dalším negativním účinkům, mezi které patří vyvolání oxidativního poškození a zánětu [9, 10].



Obrázek 1 Senilní plaky vznikající při Alzheimerově nemoci [11]

2.1.1.2 Neurofibrilární spleti

Neurofibrilární spleti jsou tvořeny hyperfosforylovaným proteinem tau, který se ukládá v cytoplazmě. Protein tau je hlavním proteinem skupiny tzv. *microtubule associated proteins* (MAP).

Mikrotubuly se skládají z tubulinu a jsou jedněmi z vláken cytoskeletu. Uplatňují se při udržování tvaru a rozměrů buněk, pohybu bičíků a řasinek a jejich hlavní funkcí je intracelulární transport.

Protein tau se vyskytuje hlavně v neuronech v mozku, kde podporuje spojování tubulinu do mikrotubulů. Tato schopnost proteinu tau přispívá ke stabilitě axonálních mikrotubulů, které tvoří dráhy pro axonální transport nervového vzruchu. Nadměrná fosforylace proteinu tau vede k jeho agregaci, čímž ztrácí schopnost podpory mikrotubulárních struktur (obr.2).

V mozku existuje 6 izoform proteinu tau, skládajících se ze 352-441 aminokyselin [12, 13].

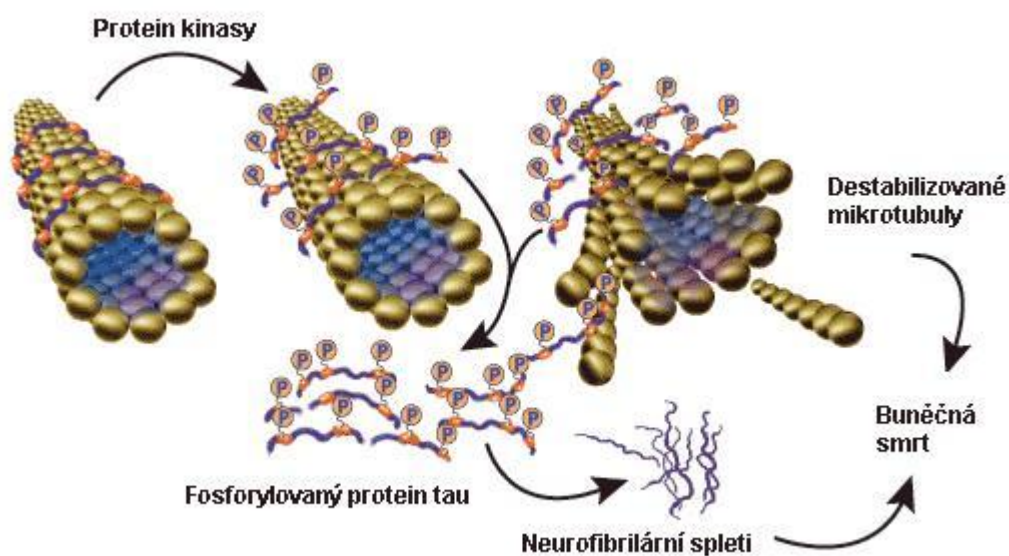
V alzheimerickém mozku je protein tau fosforylován třikrát až čtyřikrát více než v mozku zdravého člověka [5].

2.1.2 Fosforylace proteinu tau

Fosforylace proteinu tau na různých epitopech má za následek rozličné biologické a patologické účinky. Na proteinu tau vyskytujícím se v lidském mozku je 79 domnělých a více než 30 popsáných serinů a threoninů, které mohou být fosforylovány [13].

In vitro studie prokázaly, že například fosforylace proteinu tau na Thr231 inhibuje z 25% jeho vazbu na mikrotubuly. Agregaci tau proteinu podporuje hlavně fosforylace proteinu tau na Thr231, Ser396 a Ser422 [14].

Fosforylaci proteinu tau katalyzují protein kinasy, hlavními jsou glykogen syntasa kinasa 3 β (GSK-3 β), p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), c-Jun NH2-terminalní kinasa, ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), cyklin-dependentní protein kinasa 5 a cAMP-dependentní protein kinasa. Defosforylaci proteinu tau provádějí endogenní fosfatasy, nejčastěji je to fosfatasa 2A [13].



Obrázek 2 Fosforylace proteinu tau a rozpad mikrotubulárních struktur axonů [15]

2.1.3 Diabetes mellitus 2. typu a Alzheimerova nemoc

Diabetes mellitus 2. typu je metabolické onemocnění související mimo jiné také se zvyšujícím se věkem. DM2 je spojován s mnoha metabolickými a fyziologickými problémy, jako je například vysoký krevní tlak, kardiovaskulární onemocnění a vysoká hladina cholesterolu.

Příčinou této nemoci je inzulínová rezistence, která vzniká kvůli nerovnováze mezi sekrecí inzulínu a jeho využitím v metabolismu glukózy [2].

Nedávné studie potvrdily, že DM2 také dvojnásobně zvyšuje riziko vzniku AN. Bylo prokázáno, že v mozku pacientů s AN je porušena inzulínová signalizace a dochází k centrální inzulínové rezistenci. AN tedy není pouze neurologické onemocnění, nýbrž také neuroendokrinní onemocnění [16].

Mnohé studie ukazují, že DM2 a AN mají mnoho společných znaků. Obě onemocnění jsou spojená s věkem, vyskytují se u nich vysoké hladiny cholesterolu, zvýšený oxidativní stres, zánětlivé reakce, metabolické poruchy, agregace A β , hyperaktivita glykogen synthasy kinasy 3 β (GSK-3 β) a deregulace fosforylace proteinů buněčné signalizace [17, 18]. Suzanne de la Monte, která ve svých studiích pozorovala podobnosti AN a DM2, navrhla pro AN nový termín - diabetes 3. typu [4].

2.1.4 Inzulínová signalizační kaskáda

Hlavní funkcí inzulínu v periférii je regulace hladiny glukózy v krvi. Stimuluje vychytávání glukózy svaly a podkožním tukem. Nedávné studie ukázaly, že inzulín hraje také velice důležitou roli v CNS.

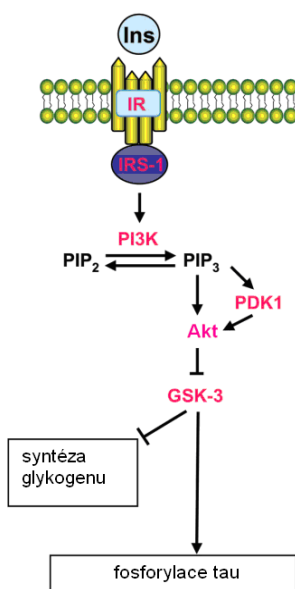
Inzulín je vytvářen téměř výhradně v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu a do mozku se dostává přes hematoencefalickou bariéru po vazbě na saturabilní receptorový systém. Nejvíce inzulínových receptorů v CNS bylo identifikováno v mozkovém kortexu, hypotalamu, hipokampu a amygdale.

Inzulín má v mozku mnoho funkcí, mezi které patří regulace příjmu potravy, centrální regulace reprodukčních funkcí, regulace neuronální proliferace a diferenciace, zajišťování správného růstu neuritů a ochrana neuronů před oxidativním stresem. Navíc je inzulínová signalizace v CNS spojována s rozvojem paměti a kognitivních funkcí a s fosforylací proteinu tau [19, 20].

Inzulínová signalizace (viz obr.3) je iniciována vazbou inzulínu na transmembránové receptory. Dochází k autofosforylaci inzulínového receptoru a aktivaci jeho tyrosin kinasové aktivity. Dále dochází k fosforylaci IRS-1 na Tyr465, čímž je aktivována regulační podjednotka p85 fosfatidyl-inositol-3-kinasy (PI3K) s následnou fosforylací fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfátu (PIP2) na fosfatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3). Ten dále aktivuje, tedy fosforyluje, fosfoinositid-dependentní proteinkinasu 1 (PDK-1) na Ser241. PDK-1 následně aktivuje proteinkinasu B (Akt) fosforylací na Thr308, a také na Ser473. Akt fosforyluje kinasu GSK-3. Fosforylace GSK-3 α na Ser21 nebo GSK-3 β na Ser9 způsobuje inhibici její kinasové aktivity [21, 22].

Pokud dojde k porušení inzulínové signální kaskády, sníží se fosfosforylace GSK-3 β (Ser9), čímž dochází ke zvýšení její kinasové aktivity. GSK-3 β je považována za jednu z hlavních kinas proteinu tau [22]. GSK-3 β přispívá k patologické fosforylaci proteinu tau převážně na Ser199, Thr231, Ser396 a Ser413 [23].

V této práci bude studována fosforylace proteinu tau na epitopech Ser396, Thr212 a Thr231. Epitopy Ser396 a Thr212 jsou fosforylovány kinasou GSK-3 β přímo, bez předchozí fosforylace jiných serinů a threoninů [14]. Navíc bylo zjištěno, že pacienti se závažnějším stadiem AN mají v mozkomíšním moku více fosforylovaný protein tau na serinu 396. Zvýšená fosforylace proteinu tau na Thr231 byla zjištěna u tzv. NIRKO myši (*neuron insulin receptor specific knockout*), které v mozku postrádají receptory pro inzulín [24].



Obrázek 3 Inzulínová signalizační kaskáda s návazností na fosforylaci proteinu tau [21]

2.1.5 O-glykosylace

O-glykosylace intracelulárních proteinů je charakterizována navázáním N-acetylglukosaminového zbytku (O-GlcNAcylation) na seriny a threoniny v blízkosti prolinů, které rovněž mohou být fosforylovány. O-glykosylace a fosforylace jsou vzájemně kompetitivní [25].

2.2 Centrálně působící látky zvyšující citlivost k inzulinu

Látky zvyšující citlivost k inzulinu mohou působit nejen v periférii ale také v mozku. Mohou tak snižovat centrální inzulinovou rezistenci, která vede k hyperfosforylaci proteinu tau a rozvoji AN [26, 27, 28]

Leptin je anorexigenní hormon tvořený v buňkách tukové tkáně. Jeho hlavní fyziologickou funkcí v organismu je adaptace na hladovění a regulace energetické bilance. U pacientů s AN byly prokázány snížené hladiny leptinu. [26]. Jeho účinky byly také popsány jako neuroprotektivní. Leptin snižoval tvorbu A β *in vitro* i *in vivo* a také fosforylaci proteinu tau *in vitro* [26, 27].

Metformin patří do skupiny biguanidů a používá se zejména u lidí s nadváhou a obezitou jako orální lék na DM2. Metformin potlačuje produkci glukózy v játrech a zvyšuje vychytávání glukózy na periférii, jako například v kosterních svalech, a tím snižuje její hladinu. Také zvyšuje citlivost jater, svalů, a jiných tkání na inzulin.

Bylo prokázáno, že metformin snižuje patologickou fosforylaci proteinu tau tím, že aktivuje jeden z hlavních enzymů defosforylujících tau protein – fosfatasu 2A [28, 29].

Gliptiny jsou perorální antidiabetika. Jsou to inhibitory dipeptidylpeptidázy 4, která zodpovídá za degradaci inkretinových hormonů, které stimulují sekreci inzulinu, viz kapitola 2.2.1 níže. Nedávné studie odhalily, že gliptiny snižují tvorbu A β a snižují fosforylaci proteinu tau [30].

2.2.1 Hormony podporující sekreci inzulinu

Glucagon like peptide-1 (GLP-1) a *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) jsou inkretinové hormony (zvyšující hladinu inzulinu), produkované intestinálními buňkami po jídle. Inkretiny při zvýšené hladině glukózy v krvi stimulují schopnosti organismu uvolňovat dostatečné množství inzulinu a inhibovat uvolňování glukagonu z pankreatu a snižují tak hyperglykémii. GLP-1 i GIP podporují pankreatické buňky v sekreci inzulinu a proliferaci [31, 32].

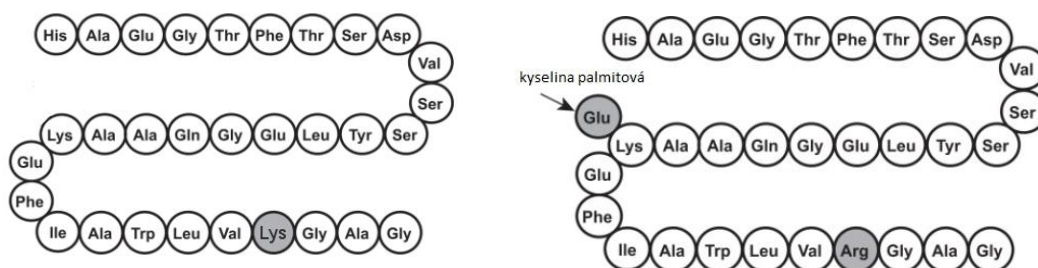
U obou hormonů, jak u GLP-1 [68], tak i u GIP [33] byly popsány neuroprotektivní účinky, jako jsou například zlepšení kognitivních funkcí, snižování tvorby A β , nebo zlepšování prostorového učení v testu Morrisova vodního bludiště. Problémem v klinické praxi je fakt, že GLP-1 i GIP podléhají rychlé degradaci v krevní plazmě [33, 68]. Proto jsou v současné době zkoumány syntetické deriváty GIP nebo analogy GLP-1, které jsou proti degradaci v krvi odolnější [33, 34, 35, 36].

Jedním ze syntetických derivátů **GIP** je například D-Ala²GIP, který je potenciálním léčivem DM2 [33].

Analog **GLP-1** liraglutid je nejpoužívanější lék na DM2 a snižuje také tělesnou hmotnost. Jeho struktura (viz obr.4) vykazuje 97% homologii s lidským GLP-1. Liraglutid má lysin v pozici 34 zaměněn za arginin. Na lysin v pozici 26 má prostřednictvím kyseliny γ -glutamové navázanou kyselinu palmitovou, která mu umožňuje vazbu na albumin a tím delší cirkulaci v krvi, větší odolnost proti degradaci a pravděpodobně i přestup přes hematoencefalitickou bariéru [34, 35].

U zvířecích modelů AN prokázaly analogy GLP-1, jako je liraglutid a agonisté receptoru GLP-1 exendin-4 a lixisenatid, protektivní účinky v CNS. Snižovaly tvorbu A β , zabráňovaly ztrátě synapsí, redukovaly oxidativní stres a zánětlivé reakce v mozku a po intrahipokampálním podání bylo pozorováno zlepšení prostorového učení v testu Morrisova vodního bludiště [31, 36].

Výzkum neuroprotektivních účinků exendinu-4 a liraglutidu je již ve fázi klinického testování pacientů s AN [34].



Obrázek 4 *Struktura GLP-1 vlevo a struktura liraglutidu vpravo*

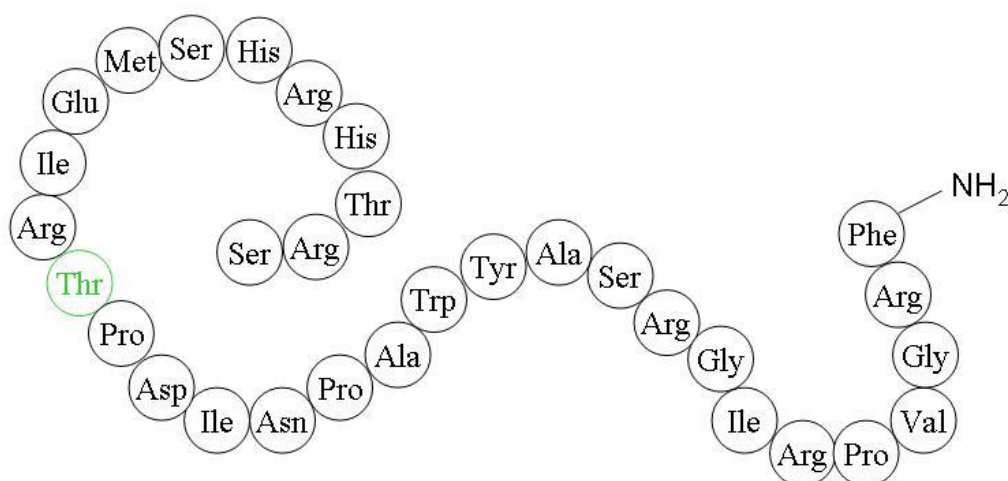
2.2.2 Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

Peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*, PrRP) byl objeven v roce 1998 jako endogenní ligand k sirotčímu receptoru GPR10 (receptor, pro který není znám žádný ligand). PrRP byl nalezen v extraktu hovězího hypotalamu jako specifický faktor uvolňující prolaktin (PRL). Odtud pochází jeho název [37].

PrRP je tvořen v neuronech v mnoha částech mozku. Nejvíce mRNA pro PrRP se exprimuje v *nucleu tractu solitarii* (NTS) a ve ventrolaterálním retikulárním jádru (VLRN) v prodloužené míše, a v hypotalamu v paraventriculárním jádru (PVN) a dorsomediálním jádru (DMN) [38, 39]. Menší množství PrRP neurony produkují v předním i zadním laloku hypofýzy a v amygdale [38]. Počty neuronů tvořících PrRP jsou stejné jak u samců, tak u samic [39]. V periferních tkáních se PrRP nachází ve dřeni nadledvin, varlatech, slinivce břišní a v tenkém i tlustém střevě [40, 41].

Receptor GPR10 je široce zastoupen v celém mozku. Neurony exprimující GPR10 byly identifikovány v předním laloku hypofýzy, v amygdale, v hypotalamu v PVN, periventriculárním jádru DMN, v mozkovém kmeni v *area postrema* v NTS a ve VLRN. V periferii se GPR10 nachází v dřeni nadledvin [38, 39].

V organismu se vyskytují dvě formy PrRP. Z preprohormonu vznikají při posttranslačních úpravách dvě aktivní formy (obr.5): PrRP31 (složen z 31 aminokyselin) a PrRP20 (složen z 20 aminokyselin), se stejnou biologickou aktivitou [42].



Obrázek 5 Lidský analog PrRP31
Zeleně je označen threonin v pozici 12, počátek PrRP20

PrRP má více fyziologických funkcí. Uvolňování prolaktinu bylo brzy zpochybněno a není pokládáno za primární funkci PrRP. Hlavní fyziologická funkce PrRP v organismu, ani mechanismus jeho účinku není doposud plně objasněn, například také proto, že není znám antagonist PrRP [42].

Jelikož se PrRP vyskytuje v oblastech mozku, které jsou velmi důležité pro řízení energetické rovnováhy, bylo zkoumáno jeho působení na regulaci příjmu potravy. Bylo prokázáno, že po intracerebroventrikulární podání PrRP31 do třetí mozkové komory, jejíž přední stěna a dno jsou tvořeny hypotalamem, dochází k inhibici příjmu potravy u potkanů a v důsledku toho dochází ke snížení tělesné hmotnosti [43]. Proto se o PrRP začalo uvažovat jako o faktoru ovlivňujícím příjem potravy. Periferním podáním peptidu PrRP příjem potravy nebyl ovlivněn, ani nebyla zjištěna zvýšená koncentrace PRL v krvi. Při těchto studiích bylo také zjištěno, že při negativní energetické bilanci, ke které dochází například při kojení či při hladovění, dochází ke snížené transkripci mRNA pro PrRP [44, 45].

Uvažuje se, že PrRP jako anorexigenní peptid s potenciálními antidiabetickými účinky by mohl ovlivňovat senzitivitu k inzulinu. Tyto účinky ovšem doposud nebyly prokázány.

V této práci byl pro zkoumání svých účinků použit analog PrRP31 palmitovaný na N-konci peptidu, který umožňuje centrální účinek PrRP po periferním podání, patrně v důsledku schopnosti prostupovat hematoencefalitickou bariéru [46].

2.3 Zvířecí modely pro výzkum DM2 a AN

Zvířecí modely jsou jednou z významných složek biologického, lékařského, veterinárního a farmakologického výzkumu.

2.3.1 Zvířecí modely pro výzkum AN

Pro výzkum AN existuje řada transgenních myších modelů. Nejčastěji používanými modely jsou APP, APP/PS1 nebo THY-Tau22 myši [47, 48, 49, 50].

APP transgenní myši vzniknou vnesením mutovaného lidského genu pro APP do myšího genomu. U těchto myší se tvoří A β již v časném dospívání a dochází ke ztrátě kognitivních funkcí [47].

APP/PS1 myši jsou dvojitě transgenní myši, které jsou nositelkami mutovaného genu pro APP a mutace v genu pro presenilin-1 (PS1), která je také zodpovědná za tvorbu A β [48].

THY-Tau22 myši jsou také transgenní myši, které exprimují lidský mutovaný tau. Mají hyperfosforylovaný protein tau, sníženou schopnost prostorového učení a paměti a poškozené synaptické funkce a plasticitu [49, 50].

2.3.2 Zvířecí modely pro výzkum DM2

Db/db myši jsou typickým modelem DM2. Jsou to myši s mutací na diabetes (db) genu, kódující gen pro leptinový receptor [51].

„Zucker“ obézní potkani - fa/fa potkani jsou modelem prediabetu. Mají mutaci receptoru leptinu a využívají se také pro výzkum hypertenze a obezity [52].

ZDF potkani (*zucker diabetic fatty*) se vyznačují obezitou, hyperglykemií, zvýšenou hladinou plazmatického cholesterolu a triglyceridů. Tento druh vznikl příbuzenským křížením hyperglykémických obézních „Zucker“ potkanů a využívá se pro studium DM2 [53].

DIO (dietou indukované obézní) myši trpí obezitou, která je velice podobná lidské obezitě. Obezita u těchto myší je vyvolána dlouhodobým krmením potravou se zvýšeným obsahem tuku. Po této dietě se u nich vyvine rezistence k leptinu a hyperglykémie. DIO myši jsou modelem používaným mimo jiné pro výzkum DM2 a obezity [54].

Další modely DM2 vyplývající z inzulínové rezistence jsou myši s obezitou vyvolanou po narození injekcemi glutamátu sodného (MSG), tzv. **MSG myši** a myší model lypodystrofického diabetu **A-ZIP F-1 myši**.

2.3.2.1 „Zucker“ obézní potkani - fa/fa potkani

Fa/fa potkani (obr.6) jsou považováni za model prediabetu [52].

U fa/fa potkanů se předčasně objevuje obezita v důsledku mutace receptoru leptinu. Mají vysoké hladiny leptinu a inzulínu v krvi, a jsou rezistentní k účinkům obou těchto hormonů [55].

V hipokampech fa/fa potkanů ve věku 33 týdnů byla v naší laboratoři prokázána snížená aktivita inzulínové signální kaskády, která vedla k hyperfosforylaci proteinu tau [56].

A:



B:



Obrázek 6 Zuckerových potkan [57]

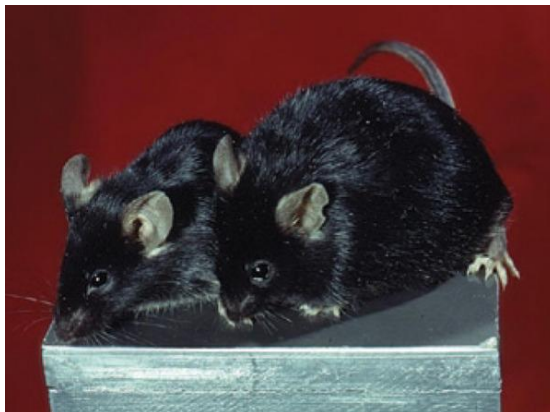
A: kontrolní potkan

B: obézní fa/fa potkan

2.3.2.2 Db/db myši

U db/db myši (viz obr.7) se vyskytuje hyperinzulinémie a hyperglykémie již v raném věku. V průběhu stárnutí ztrácejí db/db myši (podobně jako lidé trpící DM2) funkčnost pankreatu, tudíž se snižují hladiny inzulínu a extrémně zvyšují hladiny glukózy [51].

V mozkovém kortexu db/db myši byla prokázána zvýšená fosforylace proteinu tau, která se dále zvyšovala s narůstajícím věkem [58].



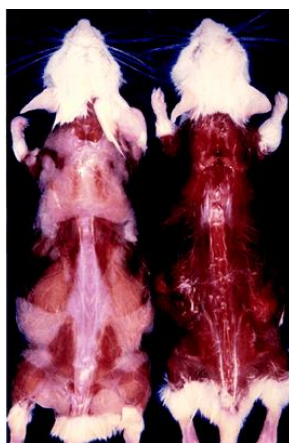
Obrázek 7 db/db myš (vpravo) a její kontrola (vlevo) [59]

2.3.2.3 A-ZIP F-1 myši

A-ZIP F-1 myši (obr.8) jsou transgenní myši exprimující dominantně-negativní protein nazývaný A-ZIP F-1, který je cíleně exprimován v tukové tkáni. Tento protein heterodimerizuje a inaktivuje domény C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) a Jun na B-ZIP (*basic leucine zipper*) transkripčních faktorech, které regulují vývoj tukové tkáně [60]. Proto tyto myši po celou dobu svého života postrádají bílou tukovou tkáň a mají redukované množství hnědé tukové tkáně, která je málo aktivní. Bílá tuková tkáň (*white adipose tissue* - WAT) je hlavním úložištěm a orgánem regulace hladiny triglyceridů a jejich využití v metabolismu. WAT se dále účastní udržování energetické rovnováhy i tím, že sekretuje hormony zvané adipokiny, jako leptin nebo adiponektin, které regulují příjem potravy a energetickou bilanci, a které chybějí u A-ZIP F-1 myší [61].

Kvůli absenci bílé tukové tkáně se všechn tuk ukládá do jater a svalů, takže A-ZIP F-1 myši trpí steatózou jater, a také mají zvětšené vnitřní orgány v důsledku nadbytku růstového hormonu [62]. Dále mají vysoké hladiny glukózy v krvi, které vedou ke zvýšené sekreci inzulínu a poté k hyperplazii a hypertrofii pankreatických β -buněk. Absence tukové tkáně dále způsobuje, že nemají téměř žádný leptin a to přispívá k vývoji inzulínové rezistence a k neplodnosti [60].

A-ZIP F-1 myši představují model lidského lipodystrofického diabetu, charakterizovaného snížením tukové hmoty, inzulínovou rezistencí a zvýšenou hladinou triglyceridů. Pacienti s tímto onemocněním často kvůli zdravotním komplikacím předčasně umírají. A-ZIP F-1 myši také umírají předčasně, pravděpodobně kvůli vysokým hladinám glukózy, které způsobují hyperosmolární kóma. Lidé i A-ZIP F-1 myši trpící lipodystrofickým diabetes mají zrychlený metabolismus, což vede k organomegalii [60, 61, 62].



Obrázek 8 A-ZIP F-1 myš (vpravo), její kontrola (vlevo) [60]

2.3.2.4 MSG myši

MSG myši mají obezitu vyvolanou glutamátem sodným v časném věku. Novorozeným myším je od druhého do pátého dne po narození subkutánně podáván glutamát sodný (MSG). To způsobuje lézi v oblasti *nucleu arcuatu* (ARC) v hypotalamu, které je centrem ovlivňujícím příjem potravy. ARC je jedním z jader hypotalamu důležitých pro regulaci příjmu potravy. MSG myši se vyznačují zmenšenou oblastí ARC, rozšířením třetí mozkové komory a zúžením *eminencia mediana*. Bylo prokázáno, že celkový počet neuronů v ARC u MSG myši byl o 75 % nižší než u kontrolních myši (obr.10), avšak v ostatních oblastech mozku MSG myši významně počet neuronů neovlivnil [63].

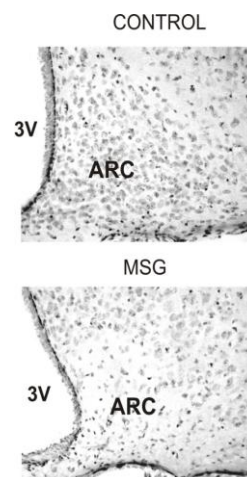
U MSG myši dochází k nerovnováze mezi příjmem potravy a výdejem energie, což vede na jedné straně k hypofágii, na druhé straně k ukládání tuků. MSG myši mají až osmkrát více bílého tuku oproti kontrolám [64].

MSG myši (obr.9) mají nedostatek růstového hormonu, tudíž bývají asi o 10 % kratší než jejich kontroly, mají atrofii hypofýzy a optických nervů a jsou neplodné [65]. Růstový hormon je znám také pro svou lipolytickou aktivitu. Předpokládá se tedy, že nadměrné ukládání tuků způsobuje i fakt, že MSG myši mají tohoto hormonu nedostatek [66].

Tyto myši mají dále zvýšené hladiny leptinu kvůli velkému množství tukové tkáně. Mají hyperinzulinémii a hyperglykémii, která je výraznější u samců a hyperleptinémie je naopak závažnější u samic MSG myši [64].



Obrázek 9 MSG myš (vpravo) a její kontrola (vlevo)



Obrázek 10 oblast ARC [66]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Persíran amonný (APS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Complete, směs inhibitorů proteas	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo
Deoxycholát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Glycin	PENTA, Chrudim, ČR
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Methanol	PENTA, Chrudim, ČR
NaCl	PENTA, Chrudim, ČR
NaF	PENTA, Chrudim, ČR
Na ₃ VO ₄	Sigma, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, Velká Británie
Trizma (Tris)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Na ₃ VO ₄	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
West Femto SuperSignal	Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Luminata Clasico/Crescendo/Forte	Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, USA
Liraglutid	Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko
Glutamát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA

3.1.2 Protilátky

Tabulka 1 Přehled primárních protilátek proti myším antigenům

Základní látka	Výrobce	Ředění
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo -Akt (Thr308)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti celkové Akt	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo -GSK-3 β (Ser9)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti GSK-3 β	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo –PDK1 (ser241)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí monoklonální protilátka proti PDK1	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pS ³⁹⁶]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:1000
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pT231]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:1000
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pT212]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:1000
Anti-Tau Cter	dar od Dr. M.-C.Galas, Inserm, Lille, Francie	1:10 000
Myši monoklonální protilátka proti Tau1 (Ser195,198,199,202)	Millipore, Billerica, MA, USA	1:10 000
Myši monoklonální protilátka proti aktinu	Sigma, St. Louis, MO, USA	1:10 000

Tabulka 2 Přehled sekundárních protilátek

Základní látka	Výrobce	Ředění
Konjugát protilátky proti králíčímu IgG připravené v koze s HRP	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:2000
Konjugát protilátky proti myšímu IgG připravené v koni s HRP	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:2000

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA. Všechny pufrы byly připravovány v deionizované vodě.

3.1.3 Přístroje

Centrifuga HETTICH Universal 320, Tuttlingen, Německo

CCD kamera, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Centrifuga Jouan C3i/CR 3, Jouan, Saint-Herblain, Francie

Spektrometr UV/VIS Jenway 6105, Richmond scientific LTD., Velká Británie

Homogenizátor Bullet Blender, Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA

Mini-Protean 3, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

XCell SureLock, Invitrogen, NY, USA

PowerPac™ HC Power Supply, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Systém Video Mot (Morrisovo vodního bludiště, Elevated plus maze), TSE systems, Bad Homburg, Německo

Glukometr (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko)

3.1.4 Peptidy

Lipidizovaný analog peptidu PrRP31s následující strukturou:

(N-palm)SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH₂

byl syntetizován metodou syntézy na pevné fázi na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, na oddělení peptidové syntézy dle postupu Maixnerové a kol [67].

Liraglutid byl komerčně získán od firmy Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Dánsko).

3.2 Experimentální zvířata

3.2.1 A-ZIP F-1 myši

A-ZIP F-1 myši byli transgenní hemizygoti kmene FVB/N (NIH, Bethesda, USA) Samice A-ZIP F-1 (n=12) a FVB (n=12) Myši byly chovány v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů akademie věd v Krči při teplotě 23 °C a měly volný přístup k pití i k potravě, standardní peletové dietě pro hlodavce (Rod 18-A, LASvendi, Soest, Germany). Rytmus světlo/tma byl nastaven na 12/12 hodin, začátek světla v 6:00 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.).

3.2.2 MSG myši

Myši samci kmene NMRI (Harlan, Itálie) byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů akademie věd v Krči při teplotě 22 ± 2 °C a měli volný přístup k potravě i k pití. Byli krmeni standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3,4 kcal/g. Rytmus světlo/tma byl nastaven na 12/12 hodin, začátek světla v 6:00 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.).

K navození obezity vyvolané glutamátem sodným byl novorozeným myším NMRI injikován subkutánně glutamát sodný (Sigma, St. Louis, USA) v dávce 4 mg/g hmotnosti myši denně od 2. do 5. postnatálního dne. V době experimentu byly MSG myši a jejich kontroly ve věku 2 a 6 měsíců.

3.2.3 Injektování peptidů zvyšujících citlivost k inzulinu

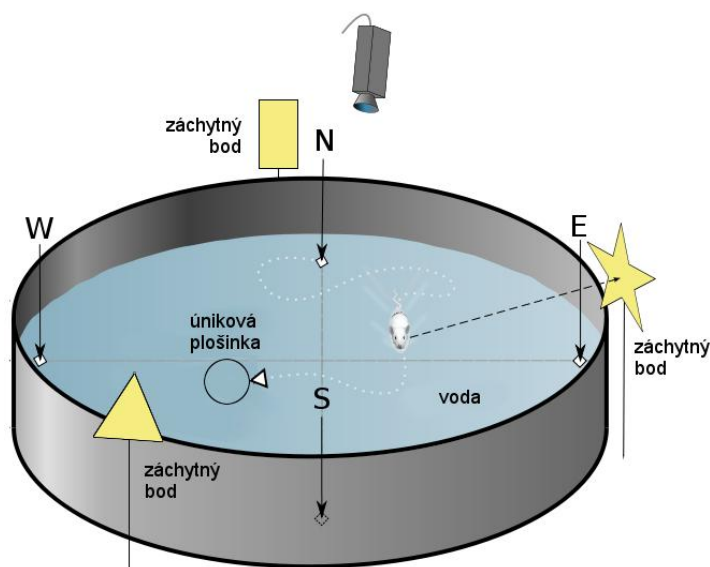
Skupinám MSG myši (n=10), byly injikovány liraglutid v dávce 0,2 mg/kg, nebo lipidizovaný analog PrRP31 v dávce 5mg/kg, které byly rozpuštěné ve fyziologickém roztoku. Injekce byly podávány subkutánně vždy 2x denně po dobu 14 dní. Kontrolám (n=10) byl podáván fyziologický roztok. Všechny látky byly podávány v dávce v objemu 0,2 ml/myš.

3.3 Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Morrisovo vodní bludiště (Morris water maze - MWM) (obr.11) je test prostorové paměti a učení, kdy pokusné zvíře hledá v otevřeném prostoru pomocí záchytných bodů únikovou plošinku umístěnou pod vodou.

Testovací aparatura se skládala z černého kruhového bazénu o průměru 120 cm a výšky 50 cm. Bazén byl naplněn vodou o teplotě 24-26 °C. Kruhová, černá, úniková plošinka s průměrem 11 cm byla pevně umístěna stále na stejném místě asi 0,5 cm pod hladinou vody, aby nebyla přímo viditelná. Na bazénu byly připevněny 3 geometrické tvary, které myším sloužily jako záchytné body pro orientaci. Místnost s testovací aparaturou byla jasně osvětlena. Nad bazénem byla umístěna kamera se sledovacím systémem (TSE Systems, Bad Homburg, Německo), která zaznamenávala čas potřebný k nalezení únikové plošinky a uplavanou dráhu myši.

Testovány byly skupiny MSG myši, A-ZIP F-1 myši a jejich kontrol. Věk myši byl 6 měsíců. Pokusné myši byly postupně vkládány do plavacího prostoru a 90 sekund ponechány, aby našly únikovou plošinku. Poté, co myš našla únikovou plošinku, byla z vody vyndána. Pokud myš únikovou plošinku nenašla, byla na ni položena na dobu 10-ti sekund, aby se mohla rozhlédnout a místo si zapamatovat, poté byla z bazénu vyndána. Tento proces byl po dobu 5 dní opakován 4x za den tak, že myš byla vložena do plavacího prostoru vždy z jiného kvadrantu bazénu (viz obrázek 11).



Obrázek 11 Morrisovo vodní bludiště

Body S, E, N, W jsou místa, kam byla myš vkládána.

3.4 Test úzkosti MSG myši a jejich kontrol - elevated plus maze (EPM)

Úzkost byla zkoumána pomocí testu v bludišti zvaném „elevated plus maze“. Bludiště ve tvaru kříže sestává ze dvou odkrytých ramen o rozměrech 25 x 5 x 0,5 cm, dvou ramen zakrytých o rozměrech 25 x 5 x 16 cm a plošinky uprostřed (5 x 5 x 0,5 cm). Aparatura byla 50 cm nad zemí. Syté MSG myši byly umístěny na plošinku uprostřed a ponechány v aparatuře 10 minut. Byla měřena dráha, kterou myši urazily v zavřených a otevřených ramenech. Pokus monitorovala kamera umístěná nad aparaturou spojená s vyhodnocovacím systémem (TSE Systems, Bad Homburg, Německo).

3.5 Glukózový toleranční test (GTT) u MSG myši po intervencích s liraglutidem a analogem PrRP31

MSG myši a jejich kontroly byly ponechány hladové přes noc (17 hodin). Ráno byla změřena bazální glukóza (odběrem krve z ocasu) glukometrem (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko). Poté byl myším injikován intraperitoneálně roztok glukózy v dávce 2 g/kg, rozpuštěné ve fyziologickém roztoku. Glukóza poté byla měřena v krvi myši v čase 15, 30, 60, 90, 120 a 180 minut po injekci.

3.6 Odběr krve a orgánů diabetických myších modelů

3.6.1 A-ZIP F-1 myši

Myši byly zváženy a dekapitovány po dvou hodinách hladovění. Byla odebrána krev a připravena plasma, která byla dále skladována při -20 °C. Dále byl myším odebrán a zvážen hnědý tuk, játra, slezina a slinivka břišní. Orgány byly uchovány v tekutém dusíku v -70 °C. Také byly na ledu vyjmuty hipokampy, které byly uloženy do vychlazeného lyzačního pufru (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH=6,8 s přídavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Triton X-100 Complete, 50 mmol dm⁻³ NaF, 1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄), a dále uchovány v -20 °C pro metodu Western blot.

3.6.2 MSG myši

MSG myši byly ponechány hladové 15 hodin. Druhý den byly zváženy a dekapitovány. Po dekapitaci byly na ledu ihned vyjmuty mozky. Byly odebrány hipokampy a uloženy ve vychlazeném lyzačním pufru (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH=6,8 s přídavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Triton X-100 Complete, 50 mmol dm⁻³ NaF,

1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄), a uchovány v -20 °C pro metodu Western blot. Dále byla odebrána krev a připravena plasma, která byla dále skladována při -20 °C. Myším byl odebrán a zvážen hnědý tuk, játra, slezina a slinivka břišní. Orgány byly uchovány v tekutém dusíku.

3.6.3 Metabolické parametry A-ZIP F-1 a MSG myší

Byly změřeny metabolické parametry. Hladina glukózy v krvi byla měřena pomocí glukometru (Arkray, Kyoto, Japan), plazmatická hladina inzulínu byla stanovena RIA testem (Millipore, St. Charles, MI, USA) a hladina leptinu pomocí testu ELISA (Millipore, St. Charles, MI, USA). Hladina triglyceridů byla stanovena enzymatickým fotometrickým testem (Lachema, Brno, Czech Republic). Všechna měření metabolických parametrů byla prováděna podle protokolů doporučených výrobcí.

3.7 Zpracování myších hipokampů

Pomocí homogenizátoru Bullet Blenderu (Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA) byly hipokampy zhomogenizovány a následně 10 minut sonikovány. Dále bylo změřeno v jednotlivých vzorcích množství bílkovin metodou Bradfordové s kalibrací na BSA [68].

Jednotlivé vzorky byly naředěny lyzačním vzorkovým pufrům (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH=6,8 s přídavkem 2% SDS, 10% glycerol, 1% bromfenol blue, 0,5% β-merkapt ethanol, 50 mmol dm⁻³ NaF, 1mmol dm⁻³ Na₃VO₄) do výsledné koncentrace proteinu 1μg μl⁻¹. Alikvoty zpracovaných myších hipokampů byly skladovány v -20 °C.

3.8 Imunodetekce specifického proteinu - metoda Western blot

3.8.1 Gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), v 10%ním polyakrylamidovém gelu byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Nejdříve byly vzorky homogenizovaných hipokampů A-ZIP F-1 myší a MSG myší 2 minuty sonikovány, dále 2 minuty zahřívány při 100 °C a nakonec byly centrifugovány 5 minut při 500 x g a 25 °C. Elektroforéza byla prováděna v elektrodovém pufru (25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glycin, 1% SDS) a probíhala při konstantním napětí ve dvou krocích, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté při 200 V po dobu 45-55 minut.

3.8.2 Přenos proteinů na PVDF nebo nitrocelulosovou membránu

Z gelu byly proteiny přeneseny na membránu PVDF-Immobilon^{TM-P} (Sigma-Aldrich, USA), nebo na nitrocelulosovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru (25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glycin, 20% methanol) při konstantním napětí 30 V po dobu 90-120 minut.

3.8.3 Imunodetekce fosforylace kinas inzulinové kaskády a proteinu tau

Membrány s přenesenými proteiny byly promyty v promývacím pufru TBS/0,1% Tween (20 mmol dm⁻³ Tris, 136 mmol dm⁻³ NaCl) 5 minut při pokojové teplotě. Dále byly membrány inkubovány na třepačce s blokujícím pufrem (TBS/0,1% Tween s přídavkem 5% netučného sušeného mléka/5% BSA, 1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄, 50 mmol dm⁻³ NaF) 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly třikrát promyty promývacím pufrem TBS/0,1% Tween po 5 minutách. Následně byly membrány inkubovány přes noc ve 4 °C s primární protilátkou zředěnou blokovacím pufrem. Druhý den byly membrány třikrát promyty promývacím pufrem po 5 minutách. Poté proběhla inkubace membrán se sekundární protilátkou značenou peroxidázou ředěnou promývacím pufrem 1:2000. Následně byly membrány opět promyty třikrát po 5 minutách v promývacím pufru TBS/0,1% Tween.

Detekce chemiluminiscence po aplikaci chemiluminiscenčního činidla Luminata byla provedena na CCD kameře.

K vyhodnocení intenzity detekovaných proužků na membránách bylo využito denzitometrické stanovení pomocí programu ImageLab (BioRad, Hercules, CA, USA).

Fosforylace kinas inzulinové kaskády a fosforylace proteinu tau v hipokampech A-ZIP F-1 a MSG myši byla vyjádřena jako poměr fosforylovaného a celkového proteinu (oba byly vztaženy na množství β-aktinu, viz kapitola 3.8.4).

3.8.4 Detekce aktinu

Pro porovnání celkového množství proteinů v jednotlivých vzorcích byl po detekci fosforylace signálních proteinů na stejných membránách detekován aktin. Nejdříve byly membrány pětkrát promyty promývacím pufrem po dobu 5 minut. Poté byly přes noc inkubovány ve 4 °C s protilátkou proti aktinu. Tato protilátka byla naředěna v blokovacím pufru 1:2000 (TBS/0,1% Tween, 5% netučného sušeného mléka, 1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄,

50 mmol dm⁻³ NaF). Následující den byly membrány promyty třikrát promývacím pufrem TBS/0,1% Tween. Poté byla aplikována sekundární protilátka proti myším IgG (ředěnou promývacím pufrem 1:2000) po dobu 1 hodiny. Membrány byly opět promyty třikrát promývacím pufrem TBS/0,1% Tween. Chemiluminiscence po aplikaci činidla Luminata-Clasicco byla detekována CCD kamerou.

3.9 Statistické vyhodnocení výsledků

K vyhodnocení metabolických parametrů myších modelů A-ZIP F-1 byla použita metoda jednocestná ANOVA s následným Studentovým t-testem v programu GraphPad (La Jolla, Kalifornie, USA).

Pro statistické vyhodnocení stanovení fosforylace proteinů v hipokampech A-ZIP F-1 myši byla použita metoda t-test s následným nepárovým testem v programu GraphPad (La Jolla, Kalifornie, USA).

K vyhodnocení metabolických parametrů myších modelů MSG a pro stanovení fosforylace kinas inzulínové kaskády a proteinu tau v hipokampech MSG myši byla použita metoda jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem v programu GraphPad (La Jolla, Kalifornie, USA).

Ke stanovení porovnání fosforylace kinas inzulínové kaskády a fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myši ve věku 2 a 6 měsíců byla použita metoda jednocestná ANOVA s následným Bonferroniho testem v programu GraphPad (La Jolla, Kalifornie, USA).

Výsledky jsou prezentovány jako průměr ±SEM. Signifikance je * P<0,05, ** P < 0,01 a *** P < 0,001, kde P je pravděpodobnost chybného zamítnutí nulové hypotézy.

4. VÝSLEDKY

4.1 Základní metabolické parametry u A-ZIP F-1 myši

U myšího modelu A-ZIP F-1 myši byla měřena hladina glukózy, inzulinu, leptinu a triglyceridů v krvi. Dále byl myším odebrán a zvážen hnědý tuk, játra, slezina a slinivka břišní.

Jak můžeme vidět v tabulce 3, měly A-ZIP F-1 myši méně hnědého tuku, větší játra, slezinu i slinivku břišní oproti kontrolním myším.

Z tabulky 4, která ukazuje metabolické parametry (měřené po dvou hodinách hladovění), je patrné, že A-ZIP F-1 myši měly zvýšené hladiny glukózy, inzulinu, leptinu i triglyceridů v krvi, v porovnání s myšmi kontrolními. Všechny rozdíly byly statisticky významné.

Tabulka 3 Hmotnosti orgánů A-ZIP F-1 myši ve srovnání s kontrolami

myši	hnědý tuk [g]	játra [g]	slezina [g]	slinivka břišní [g]
kontroly	0,14 ± 0,02	1,57 ± 0,11	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,02
A-ZIP F-1	0,05 ± 0,01**	5,33 ± 0,37***	0,30 ± 0,03***	0,32 ± 0,03***

Tabulka 4 Základní metabolické parametry A-ZIP myši a jejich kontrol (2 hodiny hladových)

myši	glukóza [mmol/l]	inzulín [ng/ml]	leptin [ng/ml]	triglyceridy [ng/dl]
kontroly	6,54 ± 0,84	4,59 ± 1,66	14,35 ± 3,07	186,68 ± 34,03
A-ZIP F-1	32,49 ± 3,44***	1189,72 ± 227,24***	0,23 ± 0,02***	1119,02 ± 213,00***

Metodika měření metabolických parametrů je popsána v kapitole 3.6.3. Data jsou průměr ± SEM, $n = 8-12$ myši. Statistika byla prováděna metodou jednocestná ANOVA s následným

Studentovým t -testem. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a

*** $P < 0,001$ ve srovnání s kontrolními myšmi.

4.2 Základní metabolické parametry u MSG myši

4.2.1 MSG myši ve věku 2 a 6 měsíců

U MSG myši ve věku 2 a 6 měsíců a jejich kontrol byla měřena hladina inzulinu, glukózy, leptinu a triglyceridů v krvi. Dále byla stanovena tělesná hmotnost, hmotnost tuků a jater.

Tabulka 5 popisuje hmotnosti myši a jednotlivých orgánů. Pozorujeme tendenci zvyšující se hmotnosti u MSG myši oproti myším kontrolním, avšak tato změna není signifikantní. Množství podkožního tuku vztažené na celkovou hmotnost myši je statisticky významně zvýšené u MSG myši dvouměsíčních i u MSG myši šestiměsíčních ve srovnání s kontrolami. Hmotnost jater, vztažená na hmotnost myši byla u kontrolních myši 2 i 6-ti měsíčních vyšší než u MSG myši stejného věku, ale nesignifikantně.

Z tabulky 6 je patrné, že jak dvouměsíční, tak i šestiměsíční MSG myši mají statisticky významně zvýšené hladiny inzulinu a leptinu v krvi oproti kontrolním myším. Hladiny glukózy v krvi nebyly u MSG myši vzhledem k jejich kontrolám signifikantně rozdílné.

Tabulka 5 Hmotnosti myši a orgánů - MSG myši a jejich kontroly ve věku 2 a 6 měsíců

myši stáří	hmotnost [g]	podkožní tuk [% hmotnosti]	játra [% hmotnosti]
MSG 2 měsíce	42,50 ± 0,59	12,04 ± 0,63 ***	3,75 ± 0,11
kontroly 2 měsíce	40,29 ± 0,94	4,54 ± 0,47	4,47 ± 0,09
MSG 6 měsíců	57,18 ± 1,26	11,46 ± 0,48 ***	3,17 ± 0,09
kontroly 6 měsíců	53,73 ± 1,84	6,88 ± 0,47	3,65 ± 0,13

Metodika měření metabolických parametrů je popsána v kapitole 3.6.3. Data jsou průměr ± SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ ve srovnání s příslušnými kontrolami stejného věku.

Tabulka 6 Základní metabolické parametry MSG myši a kontrol ve věku 2 a 6 měsíců (přes noc hladových)

myši stáří	glukóza [mmol/ml]	inzulín [ng/ml]	leptin [ng/ml]
MSG 2 měsíce	8,55 ± 0,34	3,48 ± 0,57 *	27,38 ± 4,14**
kontroly 2 měsíce	6,63 ± 0,46	0,96 ± 0,15	2,07 ± 0,43
MSG 6 měsíců	5,83 ± 0,45	3,64 ± 0,99*	18,11 ± 2,91**
kontroly 6 měsíců	6,43 ± 0,52	0,83 ± 0,27	4,03 ± 1,55

Metodika měření metabolických parametrů je popsána v kapitole 3.6.3. Data jsou průměr ± SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem. Signifikance je * $P < 0,05$ a ** $P < 0,01$ ve srovnání s příslušnými kontrolami stejného věku.

4.2.2 MSG myši po intervenci s látkami zvyšujícími citlivost k inzulinu ve věku 6 měsíců

Subkutánně 2x denně po 14 dnů byl podáván lipidizovaný analog PrRP31 v dávce 5 mg/kg nebo liraglutid v dávce 0,2 mg/kg nebo fyziologický roztok. Na konci pokusu po celonočním hladovění byl odebrán a zvážen podkožní tuk a játra, změřena hladina glukózy, a stanovena koncentrace inzulinu a leptinu v krevní plasmě.

Tabulka 7 Základní metabolické parametry MSG myši a jejich kontrol (přes noc hladových) po 14-ti dnech podávání liraglutidu a lipidizovaného analogu PrRP31

myši injikovaná látka	glukóza [mmol/ml]	inzulín [ng/ml]	leptin [ng/ml]	podkožní tuk [%hmotnosti]	játra [%hmotnosti]
MSG fyz.roztok	6,48 ± 0,42	1,53 ± 0,20	23,10 ± 3,85	2,57 ± 0,40	3,35 ± 0,17
MSG PrRP31	6,49 ± 0,32	1,57 ± 0,13	19,48 ± 2,27	2,07 ± 0,21	3,04 ± 0,10
MSG liraglutid	5,63 ± 0,34	1,91 ± 0,27	16,26 ± 1,78	1,99 ± 0,15	3,10 ± 0,14

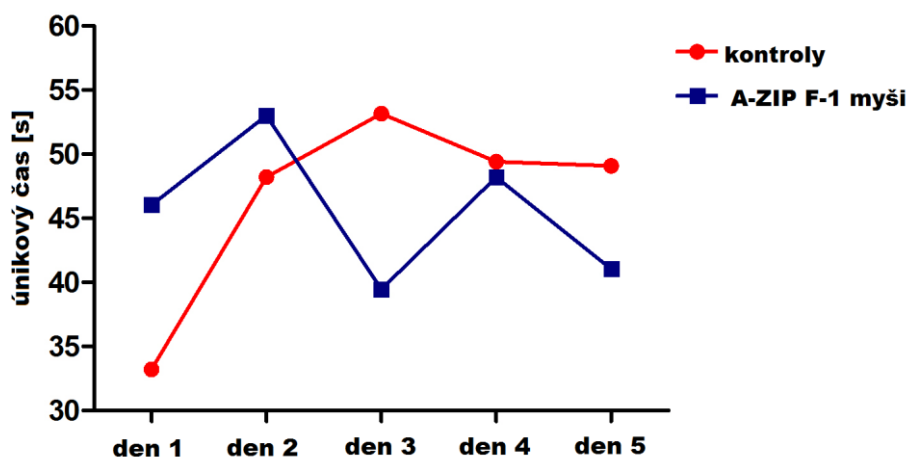
Metodika měření metabolických parametrů je popsána v kapitole 3.6.3. Data jsou průměr ± SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem.

4.3 Test prostorového učení a paměti v Morrisově vodním bludišti (MWM)

MSG myším, A-ZIP F-1 myším a jejich příslušným kontrolám, byl měřen čas, za který našly únikovou plošinku v plavacím prostoru. Pokus byl každý den opakován 4x a byl prováděn každý den, po dobu 5 dní.

4.3.1 Test MWM u A-ZIP F-1 myši

V grafu na obr.12 je znázorněn čas, potřebný k nalezení únikové plošinky každý jednotlivý den pokusu. Z grafu je patrné, že ani A-ZIP F-1 myším, ani jejich kontrolám se tento čas s pokusnými dny nezkracoval, kontrolním myším se dokonce prodloužil. U A-ZIP F-1 myši čas ve dnech dokonce kolísá. Rozdíly v časech nejsou signifikantní.

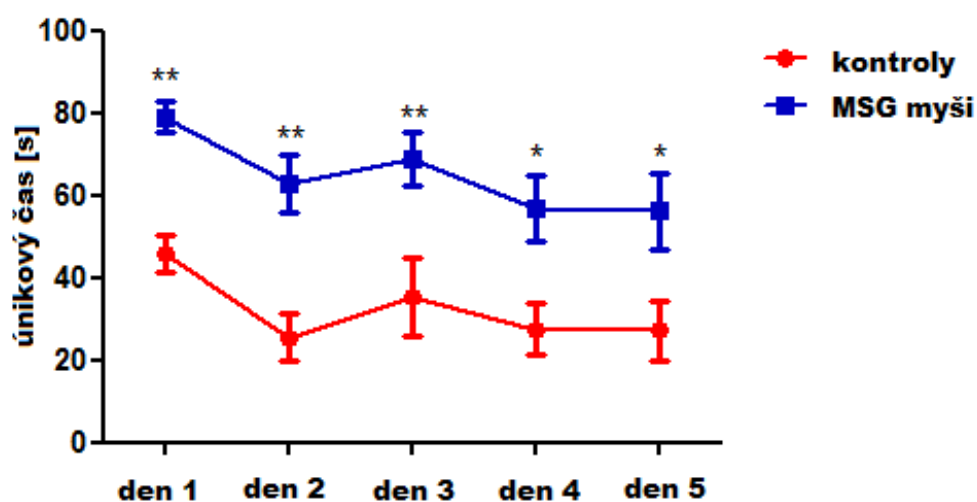


Obrázek 12 Graf znázorňující čas potřebný k nalezení únikové plošinky v testu MWM

Metodika MWM je popsána v kapitole 3.3. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA s následným Bonferroniho testem.

4.3.2 Test MWM u MSG myši ve věku 6 měsíců

Následující graf na obr.13 znázorňuje čas potřebný k nalezení únikové plošinky v testu MWM. Z grafu je patrné, že MSG myši mají tento čas signifikantně delší než jejich kontroly.



Obrázek 13 Graf znázorňující čas potřebný k nalezení únikové plošinky v testu MWM

Metodika MWM je popsána v kapitole 3.3. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA s následným Bonferroniho testem. Signifikance je

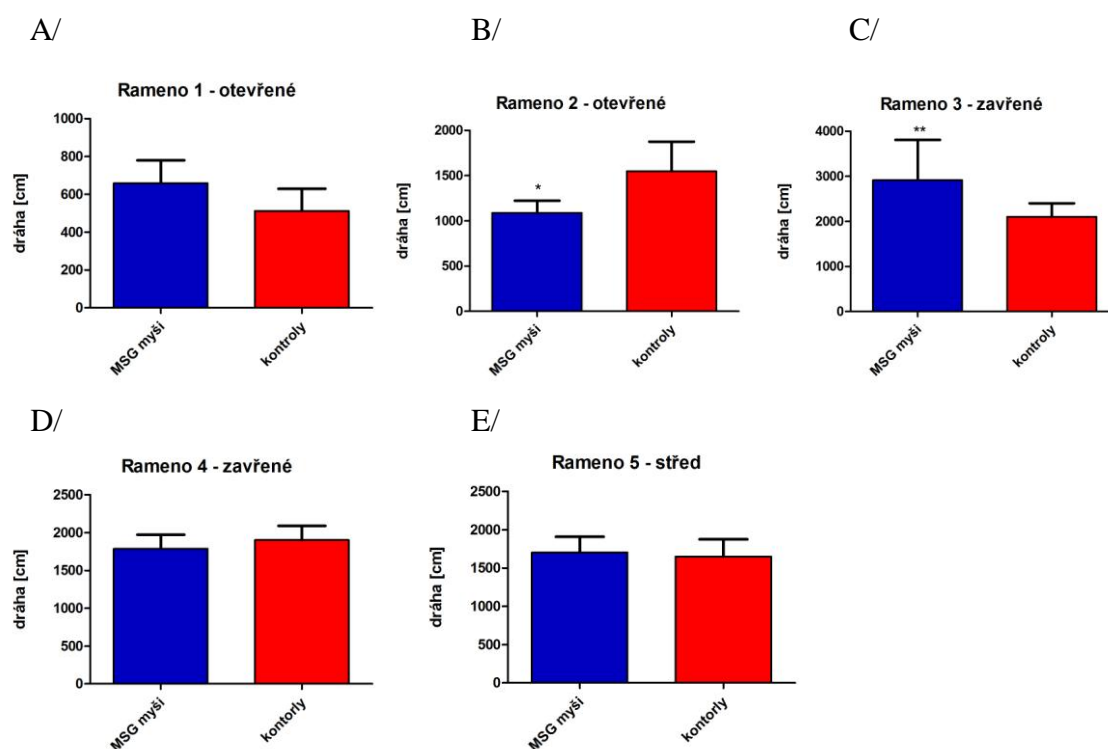
* $P < 0,05$ a ** $P < 0,01$ vzhledem ke kontrolním myším ve stejný den pokusu.

4.4 Test úzkosti u MSG myši - elevated plus maze (EPM)

Byla měřena uražená dráha MSG myši a jejich kontrol v jednotlivých zakrytých a odkrytých ramenech.

První dva grafy na obrázku 14A,B ukazují dráhu uraženou v otevřených ramenech bludiště. MSG myši urazily signifikantně kratší dráhu v otevřeném rameni č.2 viz obr.14B.

Z dalšího grafu 14C je patrné, že MSG myši urazily v zavřeném rameni č.3 výrazně delší dráhu než jejich kontroly. Na obr. 14D vidíme, že dráha v zavřeném rameni č.4 se nelišila. Nelišila se ani dráha na středu bludiště, jak ukazuje graf na obrázku 14E.



Obrázek 14 Grafy znázorňující dráhu v jednotlivých ramenech bludiště v testu elevated plus maze

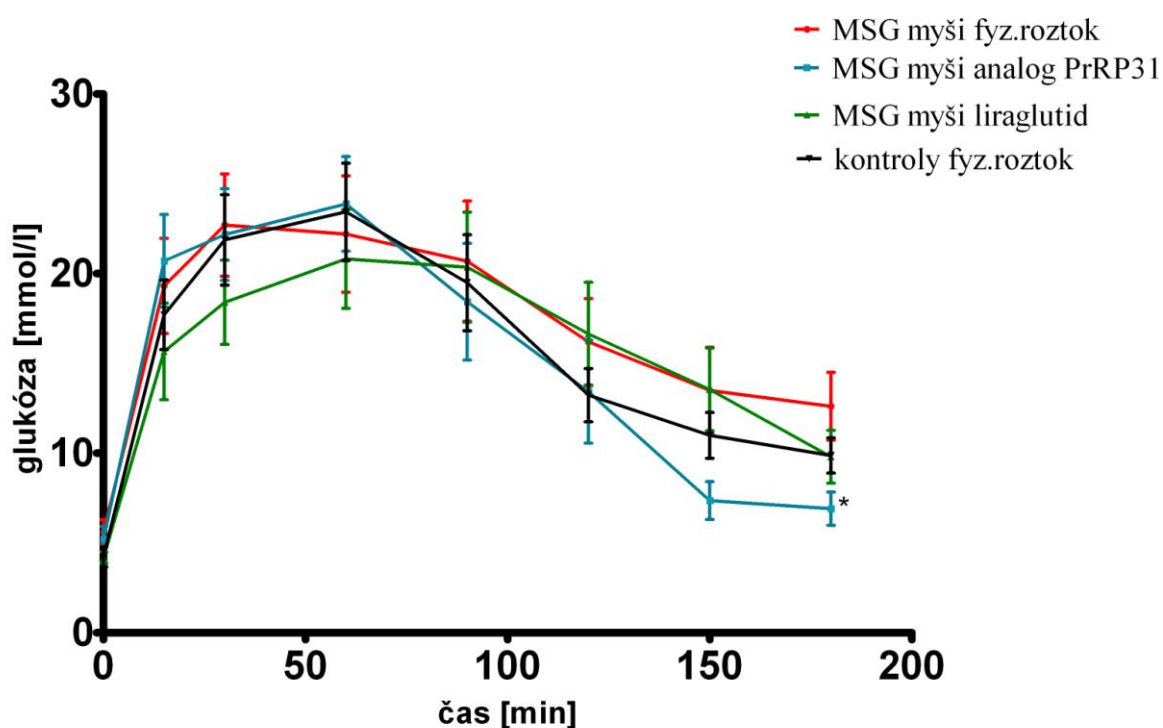
Metodika EPM je popsána v kapitole 3.4. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 10$ myši. Statistika byla prováděna pomocí metody t-test s následným nepárovým testem. Signifikance je

* $P < 0,05$ a ** $P < 0,01$ vzhledem ke kontrolním myším.

4.5 Glukózový toleranční test (GTT) u MSG myší

Hladovým MSG myším a jejich kontrolám byla změřena bazální glukóza a poté byl myším injikován intraperitoneálně roztok glukózy v dávce 2 g/kg. Glukóza poté byla měřena v krvi myší v čase 15, 30, 60, 90, 120 a 180 minut po injekci.

Jak je vidět v grafu na obrázku 15, u MSG myší v čase 180 minut po intervenci s lipidizovaným analogem PrRP31 glukóza signifikantně klesla.



Obrázek 15 Graf znázorňující GTT u MSG myší

Metodika GTT je popsána v kapitole 3.5. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 10$ myší. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA s následným Bonferroniho testem. Signifikance je

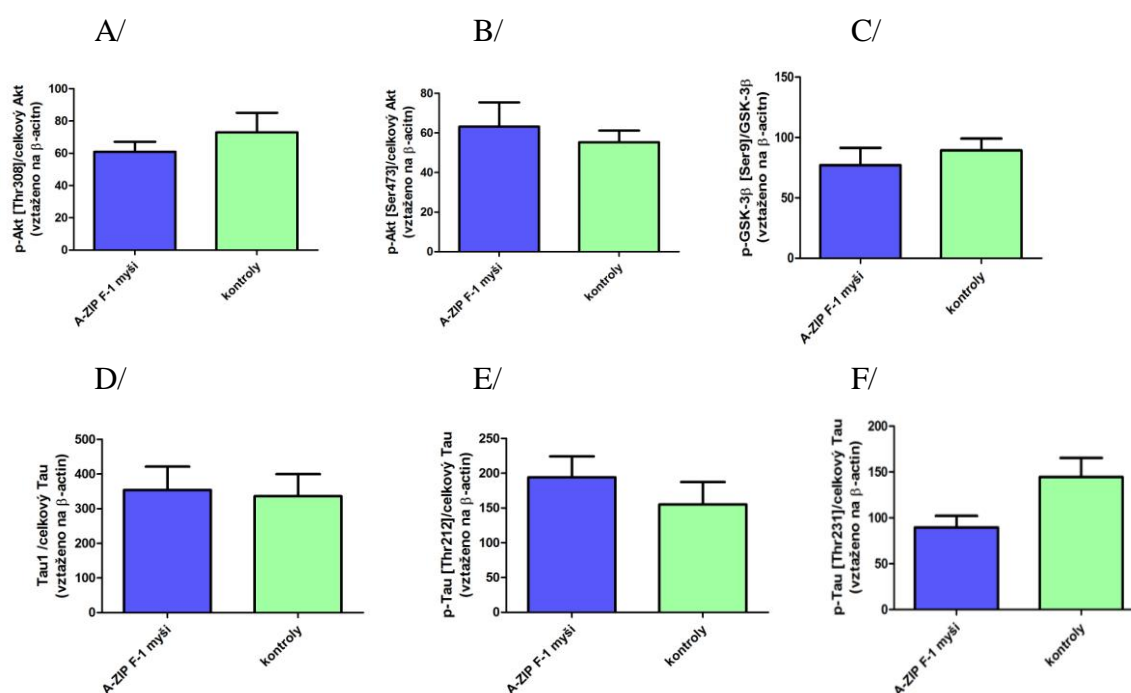
* $P < 0,05$ vzhledem ke kontrolním MSG myším.

4.6 Inzulínová signalizační kaskáda a fosforylace proteinu tau v hipokampech A-ZIP F-1 myši

U A-ZIP F-1 myši a jejich kontrol byla v hipokampech zkoumána inzulínová signalizační kaskáda pomocí imunodetekce specifickými protilátkami na Western blotech. Fosforylace kinas inzulínové kaskády a fosforylace proteinu tau v hipokampech A-ZIP F-1 myši byla vyjádřena jako poměr fosforylovaného a celkového proteinu (oba byly vztaženy na množství β -aktinu).

Nejdříve byly kvantifikovány fosforylované kinasy, které se podílejí na fosforylaci proteinu tau. Z prvního a druhého grafu na obrázku 16A,B je zřejmé, že fosforylace kinasy Akt na Thr308 a Ser473 nebyla signifikantně rozdílná. Množství fosforylované GSK-3 β (Ser9) bylo u A-ZIP F-1 myši podobné jako u jejich kontrol (obr.16C).

Množství nefosforylovaného proteinu tau (tau, který není fosforylován na epitopech Ser195, Ser198, Ser199, Ser202) bylo podobné u A-ZIP F-1 myši i jejich kontrol (obr.16D). Množství fosforylovaného proteinu tau na Thr212 a Thr231 není signifikantně rozdílné (obr.16E,F).



Obrázek 16 Fosforylace kináz inzulínové kaskády a proteinu tau v hipokampech A-ZIP F-1 myši

Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.7 a postup metody Western blot v kapitole 3.8. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 8-12$ myši na skupinu. Statistika byla prováděna metodou t -test s následným nepárovým testem.

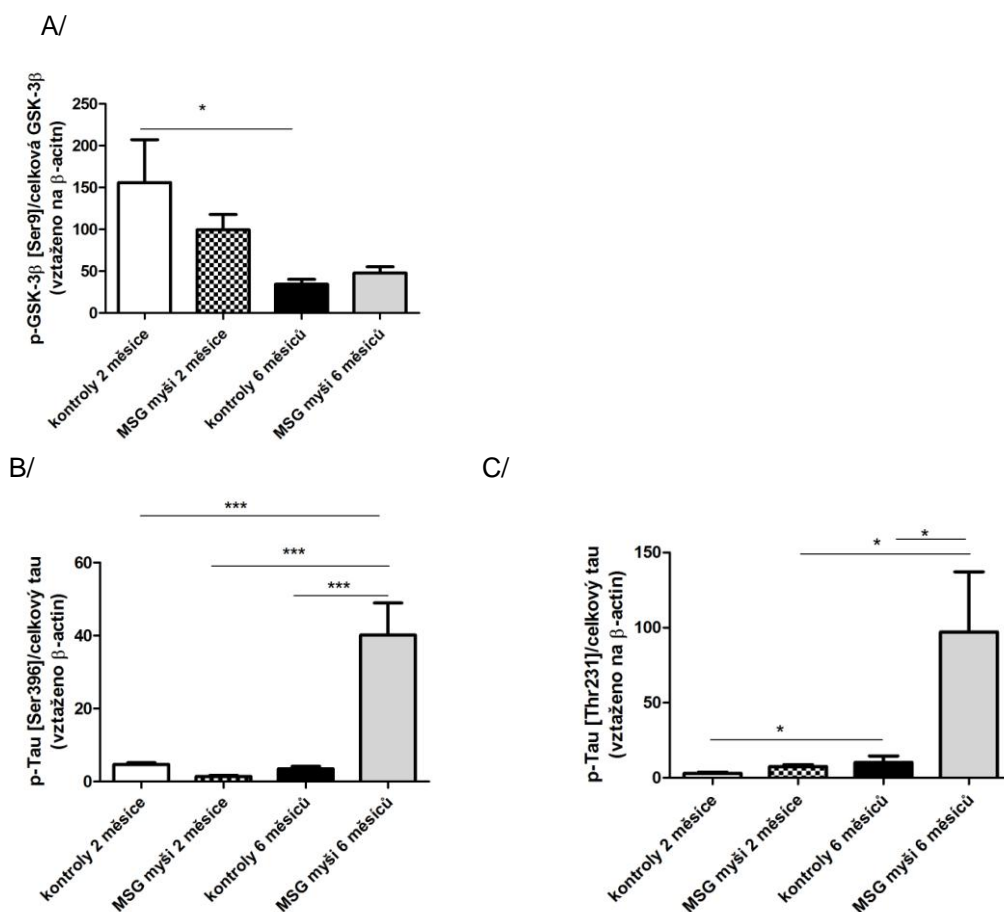
Tabulka 8 Western bloty fosforylace kinas inzulinové kaskády a proteinu tau v hipokampech *A-ZIP F-1* myši a jejích kontrol.

protilátka molekulová hmotnost	A-ZIP F-1 myši	kontroly
p-Akt (Thr308) 60 kDa		
p-Akt (Ser473) 60kDa		
celkový Akt 60 kDa		
p-GSK-3β (Ser9) 46 kDa		
celková GSK-3β 46 kDa		
Tau1 52-68 kDa		
p-Tau (Thr212) 50 kDa		
p-Tau (Thr231) 50 kDa		
celkový Tau 50 kDa		
aktin 42 kDa		

4.7 Inzulínová signalizační kaskáda a fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myší ve věku 2 a 6 měsíců

Byla zkoumána inzulínová signalizační kaskáda imunodetekcí na Western blotech v hipokampech MSG myší ve věku 2 a 6 měsíců. Fosforylace kinas inzulínové kaskády a fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myší byla vyjádřena jako poměr fosforylovaného a celkového proteinu (oba byly vztaženy na množství β -aktinu).

Byla detekována fosforylovaná GSK-3 β na Ser9. Jak je vidět na obr.17A, fosforylace této kinasy byla nižší u MSG myší oproti kontrolám již ve věku dvou měsíců, a dále se snižovala s narůstajícím věkem. Snížená fosforylace GSK-3 β na Ser9 vedla k větší kinázové aktivitě GSK-3 β a pravděpodobně zapříčinila zvýšenou fosforylaci proteinu tau na serinu 396, dále také na threoninu 231, což ukazují následující dva grafy na obr.17B a 17C.



Obrázek 17 Grafy znázorňující fosforylovanou GSK-3 β na Ser9 a fosforylovaný protein tau na Ser396 a Thr231

Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.7 a postup metody Western blot v kapitole 3.8. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 7-10$ myší na skupinu. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA a následným Bonferroniho testem. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a

*** $P < 0,001$

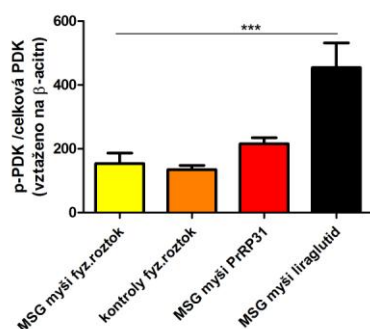
Tabulka 9 Western bloty fosforylace GSK-3 β (Ser9) a proteinu tau v hipokampech MSG myši a jejich kontrol ve věku 2 a 6-ti měsíců.

protilátka molekulová hmotnost	kontroly 2 měsíce	MSG myši 2 měsíce	kontroly 6 měsíců	MSG myši 6 měsíců
p-GSK-3 β (Ser9) 46 kDa				
celková GSK-3 β 46 kDa				
p-Tau (Ser396) 50 kDa				
p-Tau (Thr231) 50 kDa				
celkový Tau 50 kDa				
aktin 42 kDa				

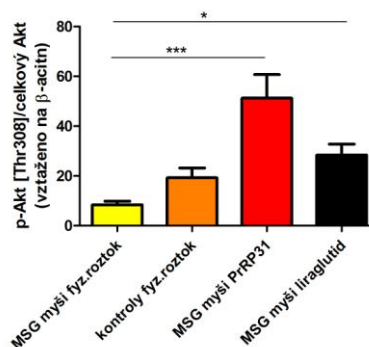
4.8 Inzulínová signalizační kaskáda v hipokampech MSG myší ve věku 6 měsíců po opakovaném podání lipidizovaného analogu PrRP31 a liraglutidu

V hipokampech MSG myší, které byly injikovány lipidizovaným analogem PrRP31 a liraglutidem, byla prokazována aktivace inzulínové signalizační kaskády, pomocí imunodetekce na Western blotech. Již u kinasy PDK-1 (viz obr.18A) dochází k významnému zvýšení fosforylace (Ser241) po podání peptidu liraglutidu. Fosforylace PDK-1 (Ser241) po podání analogu PrRP31 je také zvýšená, ale statisticky nevýznamně, jak je zřejmé z grafu 18A. Významné zvýšení fosforylace proteinu Akt na threoninu 308 u MSG myší po podání peptidu PrRP31 a liraglutidu je patrné z grafu na obr.18B a poukazuje na zvýšenou aktivaci inzulínové signální kaskády. Z grafu na obr.18C je patrné, že fosforylace Akt na serinu 473 má zvyšující se tendenci po podání analogu PrRP31 i liraglutidu, avšak není zvýšená signifikantně. Zvýšená fosforylace Akt na Thr308 vedla ke zvýšení fosforylace GSK3- β na Ser9, která je opět významně zvýšená jak po podání analogu PrRP31 tak po podání liraglutidu, viz obr.18D.

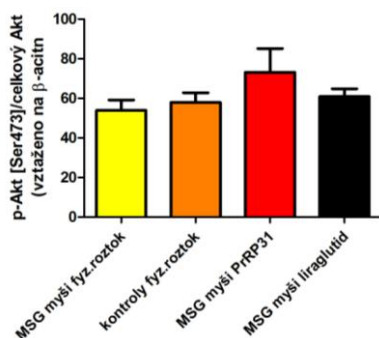
A/



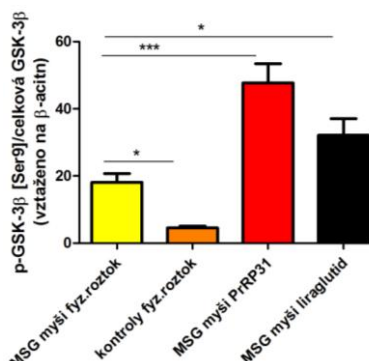
B/



C/



D/



Obrázek 18 Grafy znázorňující fosforylace proteinů v inzulínové signální kaskádě

Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.7 a postup metody Western blot v kapitole 3.8. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 7-10$ myší na skupinu. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a

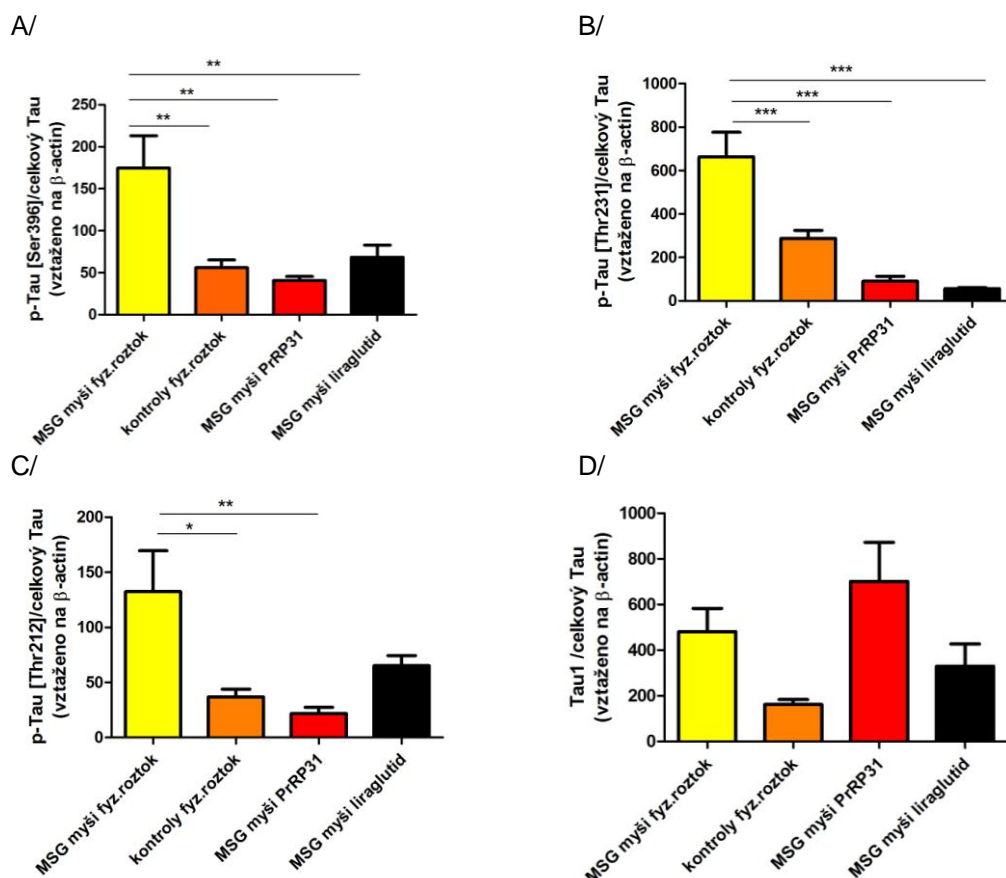
*** $P < 0,001$ v porovnání s kontrolními MSG myšmi.

Tabulka 10 Western bloty fosforylace kinas inzulinové kaskády v hipokampech MSG myši ve věku 6 měsíců po opakovaném subkutánním podávání liraglutidu a lipidizovaného analogu PrRP31

protilátka molekulová hmotnost	MSG myši fyz.roztok	kontroly fyz.roztok	MSG myši PrRP31	MSG myši liraglutid
p-PDK1 (Ser241) 58-68 kDa				
celková PDK1 58-68 kDa				
p-Akt (Thr308) 60 kDa				
p-Akt (Ser473) 60kDa				
celkový Akt 60 kDa				
p-GSK-3β (Ser9) 46 kDa				
celková GSK-3β 46 kDa				
aktin 42 kDa				

4.9 Imunodetekce fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myší ve věku 6 měsíců po opakovaném podání lipidizovaného analogu PrRP31 a liraglutidu

Množství proteinu tau a míra jeho fosforylace na jednotlivých epitopech byly stanoveny v hipokampech MSG myší imunodetekcí na Western blotech. Ve shodě s výsledky prezentovanými v kapitole 4.8 bylo prokázáno, že zvýšení fosforylace GSK-3 β na Ser9 pravděpodobně způsobilo snížení fosforylace proteinu tau na serinu 396, threoninu 231 a také threoninu 212. Z grafů na obrázku 19A, 19B a 19C je patrné, že docházelo ke statisticky významnému snížení fosforylace proteinu tau po podání jak lipidizovaného analogu PrRP31, tak i po podání liraglutidu. Dále byla detekována protilátka proti nefosforylovanému proteinu tau na epitopech Ser195, Ser198, Ser199, Ser202 (Tau1). Jak ukazuje graf na obrázku 19D, nebyly rozdíly v množství nefosforylovaného proteinu tau signifikantně rozdílné, ale můžeme pozorovat nesignifikantně vyšší množství po podání analogu PrRP31.



Obrázek 19 Fosforylace proteinu tau na různých epitopech

Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.7 a postup metody Western blot v kapitole 3.8. Data jsou průměr \pm SEM, $n = 7-10$ myší na skupinu. Statistika byla prováděna pomocí metody jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a

*** $P < 0,001$ v porovnání s kontrolními MSG myšmi.

Tabulka 11 Western bloty fosforylace proteinu tau v hipokampech MSG myši ve věku 6 měsíců po opakovaném subkutánním podávání liraglutidu a lipidizovaného analogu PrRP31.

protilátka molekulová hmotnost	MSG myši fyz.roztok	kontroly fyz.roztok	MSG myši PrRP31	MSG myši liraglutid
p-Tau (Ser396) 50 kDa				
p-Tau (Thr231) 50 kDa				
p-Tau (Thr212) 50 kDa				
Tau1 52-68 kDa				
celkový Tau 50 kDa				
aktin 42 kDa				

5. DISKUSE

Diabetes mellitus druhého typu, stejně jako Alzheimerova choroba jsou závažné nemoci se vzrůstající prevalencí. Nedávný objev souvislosti těchto chorob vede v současné době k intenzivnímu zkoumání metabolismu souvisejícím s oběma chorobami v oblasti CNS, zejména hipokampu. Naše studie, zabývající se vztahem inzulínové rezistence a fosforylace proteinu tau v hipokampu u myších diabetických modelů, je příspěvkem k tomuto tématu.

Porušení inzulínové signální kaskády v CNS zapříčiní snížení fosforylace GSK-3 β (Ser9), což způsobí její aktivaci a následnou fosforylaci proteinu tau převážně na epitopech Ser199, Thr231, Ser396 a Ser413 [23].

Při studiích inzulínové signalizace v kortexu pacientů s DM2 bylo zjištěno, že snížená aktivace této signalizace vzájemně souvisí se zvýšenou fosforylací proteinu tau [21, 15]. Tato souvislost byla ještě výraznější v kortexu pacientů s DM2, u kterých byla navíc rozvinutá AN [21].

V této práci byla inzulínová signalizace a fosforylace proteinu tau zkoumána v hipokamech myších modelů diabetu 2. typu. Byly použity myši s obezitou navozenou glutamátem sodným, tzv. MSG myši, a dále lipodystrofické A-ZIP F-1 myši.

Výsledky této práce ukázaly, že porušením inzulínové signalizace dochází ke zvýšené fosforylaci některých epitopů proteinu tau (Ser396, Thr231, Thr212) v hipokamech MSG myši.

Látky zvyšující citlivost k inzulínu jsou v současné době zkoumány pro své potenciálně neuroprotektivní účinky. V této práci byly studovány liraglutid a lipidizovaný analog PrRP31. Liraglutid je peptid používaný pro léčbu DM2, který má neuroprotektivní účinky. Jak popisuje například McClean a kol., liraglutid po dvou měsíčním injekčním periferním podávání Alzheimerickým myším zlepšoval kognitivní funkce, redukoval množství A β a zabraňoval vzniku zánětu [35]. PrRP31 je anorexigenním neuropeptidem [43] a jeho neuroprotektivita prozatím nebyla potvrzena.

5.1 Charakterizace lipodystrofických A-ZIP F-1 myší

A-ZIP F-1 myši měly sice stejnou hmotnost jako kontrolní myši, ale objevovala se u nich zřetelná organomegalie. Měly významně zvětšená játra kvůli velkému množství tuku, který v nich byl uložen. Významně větší byly také hmotnosti sleziny a slinivky břišní v porovnání s myšmi kontrolními. A-ZIP F-1 myši měly také signifikantně méně hnědé tukové tkáně v porovnání s kontrolami a postrádaly bílou tukovou tkáň. Ke stejným výsledkům došli ve svých studiích Moitra a kol., nebo Haluzík a kol. [60, 61].

Ačkoli měly lipodystrofické myši A-ZIP F-1 výrazně vyvinutou inzulinovou rezistenci v periferii, k porušení centrální inzulinové kaskády u nich nedocházelo. Detekovali jsme fosforylované kinasy Akt (Thr308, Ser473) a GSK-3 β (Ser9) v hipokampech A-ZIP F-1 myší a jejich kontrol a toto množství se významně nelišilo. Nebyly pozorovány ani změny ve fosforylaci proteinu tau (Thr231, Thr212). A-ZIP F-1 myši v důsledku absence bílé tukové tkáně nemají v krvi téměř žádný leptin, jehož účinky jsou označovány za neuroprotektivní. I přes tento fakt u A-ZIP myší nedocházelo k poruše centrální inzulinové kaskády v porovnání s myšmi kontrolními.

U A-ZIP F-1 myší v naší studii nebyla prokázána ani zhoršená paměť a prostorové učení v pokusu Morrisova vodního bludiště.

5.2 Charakterizace myší s obezitou navozenou MSG

Podáním glutamátu sodného novorozným myším byla navozena obezita, ačkoliv myši trpěly mírnou hypofagií, jak prokázaly již předchozí studie [66].

U MSG myší bylo pozorováno významně zvýšené množství podkožního tuku a nesignifikantně zvýšená hmotnost, a to jak u dvou měsíčních, tak u šestiměsíčních myší, oproti kontrolním. Stejně výsledky pozorovali ve své práci Matyšková a kol. [66]. MSG myši trpěly steatózou jater, přesto měla jejich játra nižší hmotnost, pravděpodobně kvůli snížené sekreci růstového hormonu, který mohl zapříčinit zmenšení orgánů, které popisuje u hypofýzy a pohlavních orgánů Olney a kol. [65].

Již ve věku 2 měsíců měly MSG myši rozvinutou inzulinovou rezistenci a zvýšené hladiny leptinu v krvi, což bylo pozorováno i v předchozích studiích u fa/fa potkanů [56] nebo db/db myší [58].

Statisticky významně snižená fosforylace GSK3- β (Ser9) u MSG myši dvouměsíčních i šestiměsíčních mohla zapříčinit zvýšenou fosforylaci proteinu tau na epitopech Ser396 a Thr231.

Fosforylace proteinu tau na obou zmíněných epitopech byla dále významně zvýšená u šestiměsíčních myši oproti dvouměsíčním myším. Podobné výsledky, kdy je zvýšená fosforylace proteinu tau spojována s věkem, popisují i studie na fa/fa potkanech [56] a db/db myších [58].

Naše výsledky dokazují, že periferní inzulinová rezistence u MSG myši nejspíše vedla k rozvoji centrální inzulinové rezistence a k následné fosforylaci proteinu tau v hipokampu.

Inzulinová rezistence a DM2, které vznikají v důsledku navozené obezity u MSG myši, jsou tedy spojeny s vyšším rizikem vzniku centrální inzulinové rezistence a následné fosforylace proteinu tau.

Dále bylo pomocí testu v Morrisově vodním bludišti zjištěno, že MSG myši mají signifikantně horší paměť a schopnost prostorového učení než jejich kontroly.

Tyto výsledky potvrzují, že MSG myši jsou vhodným modelem pro zkoumání neurodegenerativních změn v mozku, zvláště pak pro zjišťování ovlivnění spouštění inzulinové signalizační kaskády a hyperfosforylace proteinu tau v centrech spojených s pamětí jako je hipokampus.

5.3 MSG myši po intervencích s liraglutidem a analogem PrRP31

Ačkoli rozdíly u metabolických parametrů MSG myši po intervencích s liraglutidem a analogem PrRP31 nebyly signifikantní v porovnání s příslušnými kontrolami, bylo nesignifikantně snižené množství podkožního tuku a také hladina leptinu v krvi. Hladina inzulinu v krvi u MSG myši po intervencích s oběma peptidy i u MSG myši, kterým byl podáván fyziologický roztok, výrazně klesla oproti myším, které nebyly injikovány. Tento fakt zapříčinila pravděpodobně častější manipulace s injikovanými myši.

U MSG myši po intervenci s lipidizovaným analogem PrRP31 byla signifikantně snižená glukóza v krvi v glukózovém tolerančním testu v čase 180 minut v porovnání s kontrolními myši. Analog PrRP31 by tudíž mohl působit antidiabeticky a ovlivňovat senzitivitu k inzulinu.

Předchozí studie poukazují na neuroprotektivní účinky liraglutidu, které byly studovány zejména pomocí testu v Morrisově vodním bludišti a dalších testů chování.

Neuroprotektivní účinky jsou popsány u Alzheimerových APP/PS1 myší [35, 36], u potkanů [69], nebo u myší s obezitou vyvolanou vysokotučnou dietou [70]. Liraglutid zlepšoval paměť, synaptickou plasticitu, redukoval množství amyloidních plaků, zánětlivé reakce a zvyšoval tvorbu nových neuronů [34, 35, 36, 69, 70]. Naše studie ukazují snížení hyperfosforylace tau (Ser396, Thr231) po 14-ti denním podávání liraglutidu 6-ti měsíčním myším MSG a zároveň zvýšenou fosforylací kinas inzulínové kaskády včetně GSK-3 β na Ser9, který inhibuje aktivitu této hlavní kinasy fosforylace tau.

První námi detekovaná kinasa inzulínové kaskády byla PDK-1 (Ser241). Již zde je vidět zvýšená fosforylace po podání jak liraglutidu, tak analogu PrRP31. Významné zvýšení fosforylace kinasy Akt (Thr308), které poukazuje na zvýšení aktivace inzulínové kaskády, pozorujeme také po obou intervencích. GSK-3 β (Ser9), byla také významně více fosforylována na Ser9 po podání obou testovaných peptidů, což zapříčinilo její deaktivaci a následně tedy mohlo vést ke snížené fosforylaci proteinu tau. Protein tau byl po intervencích s analogem PrRP31 statisticky významně méně fosforylován na epitopech Ser396, Thr231, Thr212. Signifikantní byla také snížená fosforylace po intervenci s liraglutidem na epitopech Ser396 a Thr231.

Z výsledků je zřejmé, že oba námi zkoumané peptidy zvyšují aktivaci inzulínové signalizace v CNS, následně snižují fosforylaci proteinu tau, tudíž působí neuroprotektivně. U liraglutidu jsme tak potvrdili podobné výsledky, které byly prokázány v modelu myší s dietou indukovanou obezitou [70] a u modelu myší s Alzheimerovou chorobou [35], i u použitého modelu MSG obezity. V případě lipidizovaného analogu PrRP31 jde o zcela nový účinek látky, která byla nově navržena a syntetizována v našem ústavu jako potenciální antiobezitní a antidiabetická látka (příhláška patentu podána v lednu 2014). Lipidizované analogy budou dále zkoumány z hlediska neuroprotektivních účinků v myším modelu Alzheimerovy choroby, transgenních myší, které exprimují lidský mutovaný tau protein [49]. Model bude získán od spolupracujícího pracoviště z INSERM, Lille z Francie.

6. Závěr

1. U lipodystrofických A-ZIP F-1 myši a u myši s obezitou vyvolanou MSG docházelo k inzulínové rezistenci, která se projevila zvýšenou koncentrací inzulínu. A-ZIP F-1 myši také měly významně zvýšené hladiny glukózy a triglyceridů v krvi. MSG myši měly signifikantně více podkožního tuku a zvýšené hladiny leptinu a inzulínu ve srovnání s jejich kontrolami. Všechny tyto výsledky jsou ve shodě s literaturou [59, 64].

Imunodetekcí pomocí specifických protilátek na Western blotech nebyly v hipokampech A-ZIP F-1 myši v porovnání s kontrolami detekovány významné změny ve fosforylaci kinas inzulínové signalizační kaskády, ani ve fosforylaci proteinu tau.

V hipokampech MSG myši byla imunodetekcí specifickými protilátkami na Western blotech zjištěna snížená fosforylace kinas inzulínové signalizace. Byla detekována snížená fosforylace GSK-3 β (na inhibičním Ser9), která zvýšila její kinasovou aktivitu a mohla vést ke zvýšení fosforylace Ser396 a Thr231 na proteinu tau v porovnání s kontrolními myši. Proto byly MSG myši vybrány pro zkoumání centrálních účinků látek zvyšujících citlivost k inzulínu.

2. Byly potvrzeny neuroprotektivní účinky liraglutidu a lipidizovaného analogu PrRP31 v modelu MSG myši. Imunodetekce se specifickými protilátkami ve Western blotu ukázaly, že opakované subkutánní podávání liraglutidu a analogu PrRP31 zvýšilo fosforylaci kinas PDK-1 (Ser241) a významně zvýšilo fosforylaci kinas Akt (Thr308) a GSK-3 β (Ser9). Zvýšená fosforylace Ser9 v GSK-3 β snížila její kinasovou aktivitu a mohla vést k významně snížené fosforylaci proteinu tau na Ser396, Thr231 a Thr212.

V diplomové práci byly splněny vytčené cíle. Výsledky budou použity pro další studie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] V. Frisardi, V. Solfrizzi, D. Seripa, C. Capurso, A. Santamato, D. Sancarlo, G. Vendemiale, A. Pilotto, F. Panza: **Metabolit-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease.** *Ageing Res Rev*, **9** (2010) 399.
- [2] L. Li, C. Holscher: **Common Pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review.** *Brain Res Rev*, **56** (2007) 384.
- [3] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C. X. Gong: **Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease.** *J Neurochem*, **111** (2009) 242.
- [4] S. M. de la Monte, M. D., M.P. H., J.R. Wands, M. D.: **Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes-Evidence Reviewed.** *J Diabetes Sci Technol*, **2(6)** (2008) 1101.
- [5] C./X. Gong, K. Iqbal: **Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease.** *Curr Med Chem*, **15** (2008) 2321.
- [6] V. Giordano, G. Peluso, M. Iannuccelli, P. Benatti, R. Nicolai, M. Calvani: **Systemic and Brain Metabolic Dysfunction as a New Paradigm for Approaching Alzheimer's Dementia.** *Neurochem Res*, **32** (2007) 555.
- [7] E. Planel, Y. Tatebayashi, T. Miyasaka, L. Liu, L. Wang, M. Herman, W. Hang Yu, J. A. Luchsinger, B. Wadzinski, K.E. Duff, A. Takashima: **Insulin Dysfunction Induced In Vivo Tau Hyperphosphorylation through Distinct Mechanisms.** *J Neurosci*, **27** (2007) 13635.
- [8] G. Burgos, D. A. V. Zamora, C. B. Zárate: **Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity.** *Int J Dev Neurosci*, **27** (2009) 741.
- [9] Y. G. Kaminsky, M. W. Marlatt, M. A. Smith, E. A. Kosenko: **Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A β_{25-35} .** *Exp Neurol*, **221** (2010) 26.
- [10] H. S. Kim, D. Sul, J. Y. Lim, D. Lee, S. S. Joo, K. W. Hwang, S. Y. Park: **Delphinidin Ameliorates Beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity by Inhibiting Calcium Influx and Tau Hyperphosphorylation.** *Biosci Biotech Bioch*, **73** (2009) 1685.
- [11] Dostupné z URL: http://www.alz.org/braintour/plaques_tangles.asp [cit. 24.4.2014]

- [12] V. Buée-Scherrer, O. Condamines, C. Mourton-Gilles, R. Jakes, M. Goedert, B. Pau, A. Delacourte: **AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antipody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease.** *Mol Brain Res*, **39** (1996) 79.
- [13] L. Buée, T. Bussiére, V. B. Scherrer, A. Delacourte, P.R. Hof: **Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.** *Brain Res Rev*, **33** (2000) 95.
- [14] A. Leroy, I. Landrieu, I. Huvent, D. Legrand, B. Codeville, J.-M. Wieruszeski, G. Lippens: **Spectroscopic Studies of GSK3 β Phosphorylation of the Neuronal Tau Protein and Its Interaction with the N-terminal Domain of Apolipoprotein E.** *J Biol Chem*, **285**(43) (2010) 33435.
- [15] Dostupné z URL: http://teacher.bmc.uu.se/UPPSALA06/2can/disease/neuro/images/Tau_Phosphorylation.gif [cit. 24.4.2014]
- [16] Y. D. Ke, F. Delerue, A. Gladbach, J. Götz, L. M. Ittner: **Experimental Diabetes Mellitus Exacerbates Tau Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *Plos One*, **11** (2009) 7917.
- [17] S. Takeda, N. Sato, K. Uchio-Yamada, K. Sawada, T. Kunieda, D. Takeuchi, H. Kurinami, M. Shinohara, H. Rakugi, R. Morishita: **Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes.** *P Natl Acad Sci USA*, **107** (2010) 7036.
- [18] E. M. Schrijvers, J. C. Witteman, E. J. Sijbrands, A. Hofman, P. J. Koudstaal, M. M. Breteler: **Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study.** *Neurology*, **75**(22) (2010) 1982.
- [19] W. A. Banks, J. B. Owen, A. Erickson: **Insulin in the Brain: There and back again.** *Pharmacol Therapeut*, **136** (2012) 82.
- [20] S. Cardovo, S. Correia, R. X. Santos, C. Carvalho, M. S. Santos, C. R. Oliveira, G. Perry, M. A. Smith, X. Zhu, P.I. Morreia: **Insulin is a Two-Edged Knife on the Brain.** *J Alzheimers Dis*, **18** (2009) 483.
- [21] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Ch. X. Gong: **Deficient brain insulin signaling pathway in Alzheimer's disease and diabetes.** *J Pathol*, **225** (2011) 54.
- [22] C.G. Jolivalt, C.A. Lee, K.K. Beiswenger, J.L. Smith, M. Orlov, M.A. Torrance, E. Masliah: **Defective Insulin Signaling Pathway and Increased Glycogen Synthase Kinase-3 Activity in the Brain of Diabetic Mice: Parallels With Alzheimer's Disease and Correction by Insulin.** *J Neurosci Res*, **86** (2008) 3265.

- [23] G. Michel, M. Mercken, M. Murayama, K. Noguchi, K. Ishiguro, K. Imahori, A. Takashima: **Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells.** *Biochim Biophys Acta*, **1380(2)** (1998) 177.
- [24] M. Schubert, D. Gautam, D. Surjo, K. Ueki, S. Baudler, D. Schubert, T. Kondo, J. Alber, N. Galldiks, E. Kustermann, S. Arndt, A. H. Jacobs, W. Krone, C. R. Kahn, J. C. Bruning: **Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases.** *P Natl Acad Sci USA*, **101** (2004) 3100.
- [25] Y. Deng, B. Li, Y. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C. X. Gong: **Dysregulation of Insulin Signaling, Glucose Transporters, O-GlcNAcylation, and Phosphorylation of Tau and Neurofilaments in the Brain.** *Am J Pathol*, **175** (2009) 2089.
- [26] S. J. Greco, K. J. Bryan, S. Sarkar, X. Zhu, M. A. Smith, J. W. Ashford, J. M. Johnson, N. Tezapsidis, G. Casadesus: **Leptin Reduces Pathology and Improves Memory in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *J Alzheimers Dis*, **19(4)** (2010) 1155.
- [27] N. Tezapsidis, J. M. Johnston, M. A. Smith, J.W. Ashford, G. Casadesus, N.K. Robakis, B. Wolozin, G. Perry, X. Zhu, S.J. Greco, S. Sarkar: **Leptin: A Novel Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease.** *J Alzheimers Dis*, **16** (2009) 731.
- [28] E. Kickstein, S. Krauss, P. Thornhill, D. Rutschow, R. Zeller, J. Sharkey, R. Williamson, M. Fuchs, A. Köhler, H. Glossmann, R. Schneider, C. Sutherland, S. Schweiger: **Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling.** *P Natl Acad Sci USA*, (2010).
- [29] J. Li, J. Deng, W. Sheng, Z. Zuo: **Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese leptin-resistant mice.** *Pharmacology*, **101** (2012) 564.
- [30] J. Kosaraju, C. C. Gali, R. B. Khatwal, A. Dubala, S. Chinni, R. M. Holsinger, V. S. Madhunapantula, S. K. Muthureddy Nataraj, D. Basavan: **Saxagliptin: a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease.** *Neuropharmacology*, **72** (2013) 291.
- [31] D. Porter, E. Faivre, P. R. Flatt, C. Hölsher, V. A. Gault: **Actions of incretin metabolites on locomotor activity, cognitive function and *in vivo* hippocampal synaptic plasticity in high fat fed mice.** *Peptides*, **35** (2012) 1.
- [32] C. M. Long-Smith, S. Manning, P. L. McClean, M. F. Coakley, D. J. O'Halloran, C. Holscher, C. O'Neill: **The Diabetes Drug Liraglutide Ameliorates Aberrant Insulin**

Receptor Localisation and Signalling in Parallel with Decreasing Both Amyloid- β Plaque and Glial Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuromol Med*, **15** (2013) 102.

[33] E. Faivre, C. Holscher: **Neuroprotective effects of D-Ala2GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model.** *Alzheimers Res Ther*, **5** (2013) 20.

[34] C. Holscher: **Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative disease.** *J Endocrinol*, **221** (2014) 31.

[35] P. L. McClean, C. Holscher: **Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer disease.** *Neuropathology*, **76** (2014) 57.

[36] P. L. McClean, V. Parthasarathy, E. Faivre, C. Holscher: **The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *J Neurosci*, **31**(17) (2011) 6587.

[37] S. Hinuma, Y. Habata, R. Fujii, Y. Kawamata, M. Hosoya, S. Fukusumi, C. Kitada, Y. Masuo, T. Asano, H. Matsumoto: **A prolactin-releasing peptide in the brain.** *Nature* **1998**, **393** (6682) 272.

[38] M. Maruyama, H. Matsumoto, K. Fujiwara, C. Kitada, S. Hinuma, H. Onda, M. Fujino, K. Inoue: **Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain.** *Endocrinology*, **140**(5) (1999) 2326.

[39] Y. Lee, S. Yang, M. Soares, J. Voogt: **Distribution of prolactin-releasing peptide mRNA in the rat brain.** *Brain Res Bull*, **51**(2) (2000) 171.

[40] M. Nieminen, A. Brandt, P. Pietilä, P. Panula: **Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat.** *Peptides*, **21**(11) (2000) 1695.

[41] K. Fujiwara, H. Matsumoto, T. Yada, K. Inoue: **Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland.** *Regul Pept*, **126**(1-2) (2005) 91.

[42] E. Valassi, M. Scacchi, F. Cavagnini: **Neuroendocrine control of food intake.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **18**(2) (2008) 158.

[43] C. Lawrence, F. Celsi, J. Brennand, S. Luckman: **Alternative role for prolactin releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci*, **3**(7) (2000) 645.

- [44] J. Maixnerová, A. Spolcová, M. Pýchová, M. Blechová, T. Elbert, M. Rezáčová, B. Zelezná, L. Maletínská: **Characterization of prolactin-releasing peptide: Binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** *Peptides*, **32(4)** (2011) 811.
- [45] C. Lawrence, F. Celsi, J. Brennand, S. Luckman: **Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci* **3(7)** (2000) 645.
- [46] ÚOCHB AVČR, **Lipidizované peptidy jako antiobezitika**,
Vynálezce: L. Maletínská, B. Železná, M. Blechová, A. Špolcová, Přihl: 12.07.2012,
Čís.patentu: PV 2012-476, GAČR.
- [47] J. Koppel, V. Vingtdeux, P. Marambaud, C. d'Abramo, H. Jimenez, M. Stauber, R. Friedman, P. Davies: **CB2 Receptor Deficiency Increases Amyloid Pathology and Alters Tau Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *Mol Med*, **20** (2014) 29.
- [48] DR. Borchelt: **Metabolism of presenilin 1: influence of presenilin 1 on amyloid precursor protein processing.** *Neurobiol Aging* **19** (1998) 15.
- [49] K. Schindowski, A. Bretteville, K. Leroy, S. Bégard, J.P. Brion, M. Hamdane, L. Buée: **Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficit and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits.** *Neurobiology*, **169** (2006) 599.
- [50] A. Van der Jeugd, T. Ahmed, S. Burnouf, K. Belarbi, M. Hamdane, M.E. Grosjean, S. Humez, D. Balschun, D. Blum, L. Buée, R. D'Hooge: **Hippocampal tau pathology in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission.** *Neurobiol Learn Mem*, **95** (2011) 296.
- [51] D. Senador, K. Kanakamedala, M.C. Irigoyen, M. Morris, Khalid M. Elased: **Cardiovascular and autonomic phenotype of db/db diabetic mice.** *Exp Physiol*, **94** (2009) 648.
- [52] T.W. Kurtz, R.C. Morris, H.A. Pershadsingh: **The Zucker Fatty Rat as a Genetic Model of Obesity and Hypertension.** *Hypertension* **13** (1989) 896.
- [53] B. L. Leonard, R. N. Watson, K. M. Loomes, A. R. J. Phillips, G. J. Cooper: **Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes.** *Acta Diabetol* **42** (2005) 162.

- [54] V. Heek, D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, H. R. Davis Jr.: **Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin.** *J Clin Invest*, **99(3)** (1997) 385.
- [55] A.H. Durham, G.E. Truett: **Development of insulin resistance and hyperphagia on Zucker fatty rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290** (2006) 652.
- [56] B. Mikulášková: **Vliv různých druhů antidiabetických intervencí na vývoj neurodegenerativních změn in vitro a in vivo.** *Bakalářská práce* 2012
- [57] Dostupné z URL: http://www.crcjussieu.fr/crc/index.php?cible=projet_equipe&id=8&spgmGal=equipes/08&PHPSESSID=ee1312cba6f0415cea78f7de4a807020
[cit. 24.4.2014]
- [58] B. Kim, C. Backus, S. Oh, J.M. Hayes, E.L. Feldman: **Increased Tau Phosphorylation and Cleavage in Mouse Models of Type 1 and Type 2 Diabetes.** *Endocrinology*, **150** (2009) 5294.
- [59] Dostupné z URL: <http://blogs.scientificamerican.com/scicurious-brain/files/2012/02/dbdb-mouse.jpeg> [cit. 24.4.2014]
- [60] J. Moitra, M. M. Mason, M. Olive, D. Krylov, O. Gavrilova, B. Marcus-Samuels, L. Feigenbaum, E. Lee, T. Aoyama, M. Eckhaus, M. L. Reitman, C. Vinson: **Life without white fat: a transgenic mouse.** *Genes Dev*, **12(20)** (1998) 3168.
- [61] M. Haluzik, K. R. Dietz, J. K. Kim, B. Marcus-Samuels, G. I. Shulman, O. Gavrilova, M. L. Reitman: **Adrenalectomy Improves Diabetes in A-ZIP/F-1 Lipotrophic Mice by Increasing Both Liver and Muscle Insulin Sensitivity.** *Diabetes*, **51** (2002) 2113.
- [62] J. K. Kim, J. J. Fillmore, O. Gavrilova, L. Chao, T. Higashimori, H. Choi, H.-J. Kim, C. Yu, Y. Chen, X. Qu, M. Haluzik, M. L. Reitman, G. I. Shulman: **Differential Effects of Rosiglitazone on Skeletal Muscle and Liver Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice.** *Diabetes*, **52** (2003) 1311.
- [63] F. Elefteriou, S. Takeda, X. Liu, D. Armstrong, G. Karsenty: **Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass.** *Endocrinology*, **144(9)** (2003) 3842.
- [64] L. Maletínská, R. Toma, Z. Pirník, A. Kiss, J. Slaninová, M. Haluzik, B. Zelezná: **Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice.** *Regul Pept*, **136(1-3)** (2006) 58.
- [65] J. Olney: **Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.** *Science*, **164(880)** (1969) 719.

- [66] R. Matysková, L. Maletínská, J. Maixnerová, Z. Pirník, A. Kiss, B. Zelezná: **Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice.** *Physiol Res*, **57(5)** (2008) 727.
- [67] J. Maixnerová, J. Hlaváček, D. Blokesová, W. Kowalczyk, T. Elbert, M. Sanda, M. Blechová, B. Zelezná, J. Slaninová, L. Maletínská: **Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments.** *Peptides* **28/10** (2007) 1945.
- [68] M. Bradford: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, **72** (1976) 248.
- [69] W.-N. Han, C. Holscher, L. Yuan, W. Yang, X.-H. Wang, M.-N. Wu, J.-S. Qi: **Liraglutide protects against amyloid- β protein-induced impairment of spatial learning and memory rats.** *Neurobiol Aging*, **34** (2013) 576.
- [70] D. W. Porter, B. D. Kerr, P. R. Flatt, C. Holscher, V. A. Gault: **Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance.** *Diabetes*, **12** (2010) 891.